

Veränderungen von Rohkaffees während der Aufbereitung
und Lagerung: Physiologische Hintergründe der
Qualitätsausprägung von Rohkaffees

Vom Fachbereich für Biowissenschaften und Psychologie
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von: Sven-Erik Knopp

aus: Salzgitter

1. Referentin oder Referent: Professor Dr. D. Selmar
2. Referentin oder Referent: Professor Dr. P. Winterhalter
eingereicht am: 30.09.2005
mündliche Prüfung (Disputation) am: 24.11.2005
(2005)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen:

Bytof, G., Knopp, S.-E., Schieberle, P., Teutsch, I., Selmar, D.: Influence of processing on the generation of γ -aminobutyric acid in green coffee beans. European Food Research and Technology, 220: 245-250 (2005).

ASIC-Tagungsbeiträge:

Selmar, D., Bytof, G., Knopp, S.-E.: New Aspects of Coffee Processing: The Relation Between Seed Germination and Coffee Quality. (CD) 19^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Triest (2001), ASIC, Paris.

Selmar, D., Bytof, G., Knopp, S.-E., Bradbury, A., Wilkens, J., Becker, R.: Biochemical insights into coffee processing: Quality and nature of green coffees are interconnected with an active seed metabolism. (CD) 20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Bangalore, 111-119 (2004), ASIC, Paris.

Bytof, G., Knopp, S.-E., Selmar, D.: Accumulation of the stress metabolite γ -aminobutyric acid (GABA) in coffee seeds (*Coffea arabica* L.) during post harvest processing. (Poster) 20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Bangalore, 254-256 (2004), ASIC, Paris.

Selmar, D., Hunecke, D., Junghärtchen, I., Breitenstein, B., Bytof, G., Knopp, S.-E.: Expression of isocitrate lyase and the abundance of β -tubulin: Feasible markers for the estimation of germination processes in differently processed green coffees. (Poster) 20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café, Bangalore, 257-260 (2004), ASIC, Paris.

Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 5.-10.09.2004 in Braunschweig:

Knopp, S.-E., Bytof, G., Selmar, D.: Changes of low molecular carbohydrates during the storage of coffee beans (*Coffea arabica* L.). (Poster) Botanikertagung, Braunschweig (2004).

Hunecke, D., Junghärtchen, I., Breitenstein, B., Knopp, S.-E., Bytof, G., Selmar, D.: Expression of Isocitrate Lyase and the abundance of β -Tubulin: Reliable markers to confirm differences of the germination status of differently processed green coffees. (Poster) Botanikertagung, Braunschweig (2004).

Zur Veröffentlichung eingereicht:

Knopp, S.-E., Bytof, G., Selmar, D.: Influence of Processing on the content of sugars in green arabica coffee beans. Eingereicht bei European Food Research and Technology.

Selmar, D., Bytof, G., Knopp, S.-E., Breitenstein, B.: Germination of coffee seeds and its significance for coffee quality. Eingereicht bei Plant Biology.

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Mentor Professor Dr. Dirk Selmar, der mein Interesse am Themenkomplex Kaffee weckte und mir dann diese Arbeit erst ermöglichte. Danken möchte ich ihm zudem dafür, dass er mir im Laufe der Arbeit stets für angeregte fachliche Diskussionen zur Verfügung stand und mich mit einem umfangreichen Aufgabengebiet vertraut machte.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Peter Winterhalter für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Professor Heiko Cammenga danke ich für sehr aufschlussreiche Diskussionen auf dem Gebiet der Kaffeetechnologie.

Zu besonderem Dank verpflichtet bin ich auch Frau Antje Müller und Frau Daniela Kramer für ihre stetige Hilfsbereitschaft bei den unzähligen Aufbereitungen für die Analytik der Kohlenhydrate und Aminosäuren und Frau Daniela Kramer speziell für die sehr gute Arbeit bei der Bestimmung zur Expression der Isocitratlyase. Frau Antje Müller danke ich speziell für ihre Hilfe bei der Bestimmung der GABA-Gehalte und weiterer Aminosäurebestimmungen.

Herrn Björn Breitenstein danke ich sehr für die Unterstützung bei der Bestimmung der 4C-Nuclei sowie der β -Tubulin-Gehalte. Frau Sabrina Hartmann, Nina Kahlefeld und Mirko Geisler möchte ich danken für ihre Unterstützung bei enzymatischen Bestimmungen.

Ich möchte auch allen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitsgruppe Selmar und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pflanzenbiologie in der Mendelssohnstraße, die hier nicht namentlich erwähnt sind, für tatkräftige Unterstützung bei den Modellaufbereitungen im Labor und ihre gute Kollegialität danken. Auch anderen Kollegen des Instituts möchte ich für ihre Mithilfe danken. Hierbei sei besonders Herr Birke hervorgehoben, ohne den so manches Gerät im Institut nicht mehr arbeiten würde. Ein ganz besonderer Dank gilt zudem meinem Kollegen Dr. Gerhard Bytof für seine Unterstützung bei der Probenerstellung in Brasilien und seine stets anregenden Diskussionen auf dem Gebiet des Kaffees. Außerdem möchte ich ihm besonders für die Probenbeschaffung der frischen Kaffeefrüchte aus Tansania und Mexiko danken.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Jochen Wilkens (*TCHIBO GmbH*, Hamburg) und Herrn Dr. Allan Bradbury (*KRAFT Foods*, München) dafür, dass sie sich stets für die gemeinsamen Forschungsprojekte engagiert haben und so die Kaffeeforschung an unserem Institut aktiv unterstützt haben.

Herrn Dr. Steven Groot und Herrn Jan Bergervoet (*Plant Research International*, Wageningen, Niederlande) danke ich stellvertretend für die ganze Arbeitsgruppe dort in Wageningen für die Unterstützung bei den Analysen mittels Flowcyometry.

Des Weiteren danke ich der Firma *DIONEX* für die Unterstützung bei meiner Kaffeeforschung.

Ich danke dem Botanischen Garten Braunschweig und dem Tropengewächshaus Witzenhausen für die Bereitstellung von frischen Kaffee Früchten für die Analysen.

Herrn Washington Rodrigues (*Ipanema Agricola Industria Ltd.*, Alfenas, Minas Gerais, Brasilien) danke ich für die Möglichkeit gemeinsam mit Dr. Gerhard Bytof auf den Kaffeeplantagen der *Ipanema* Feldversuche durchzuführen. Stellvertretend für die Belegschaft dort möchte ich Herrn Antonio Carlos Michelotto für die exzellente Unterstützung danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin und meinen Freunden sowie ganz besonders meiner Familie, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden mit der finanziellen Unterstützung des Forschungskreises der Ernährungsindustrie e.V. (FEI) im Rahmen des Forschungsprojektes 13234 N durchgeführt.

Für meine Eltern

1.	EINLEITUNG.....	12
1.1.	Die Bedeutung von Kaffee als Wirtschaftsgut.....	12
1.2.	Rohkaffeeaufbereitung und Kaffeequalität.....	12
1.2.1	Kaffeeernte und Kaffeeaufbereitung	13
1.2.2	Verschiffung und Lagerung von Rohkaffee	15
1.2.3	Einflüsse von Nacherntebehandlung und Lagerung auf die Qualität.....	16
1.2.4	Die Bildung des Kaffeeröstaromas	17
1.3.	Fragestellung.....	20
1.4.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	21
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	Pflanzenmaterial.....	22
2.2	Probenherstellung.....	22
2.2.1	Kaffeeaufbereitungen	23
2.2.1.1	Musteraufbereitungen im Labor	23
2.2.1.2	Modellaufbereitungen in Brasilien	24
2.3	Lagerungsbedingungen des Rohkaffees.....	26
2.3.1	Erörterung der Lagerungsbedingungen	26
2.3.2	Gewählte Lagerungsbedingungen	27
2.4	Bestimmung der sensorischen Eigenschaften.....	29
2.5	Bestimmung der Vitalität der Kaffeesamen	30
2.6	Bestimmung von hydrolytischen Enzymen	31
2.6.1	Endo- β -mannanase	31
2.6.2	β -Mannosidase.....	31
2.6.3	α -Galactosidase.....	32
2.7	Bestimmung der freien Aminosäuren	32
2.7.1	Vorbereitung des Probenmaterials.....	33
2.7.2	Extraktion	33
2.7.3	Derivatisierung	33
2.7.4	HPLC-Bestimmungsparameter	34
2.8	Bestimmung der löslichen niedermolekularen Kohlenhydrate	35
2.8.1	Vorbereitung des Probenmaterials.....	35
2.8.2	Extraktion	35
2.8.3	Ionenchromatographische Bestimmung	35
2.8.4	Chromatogramme und Kalibrierungen der HPAEC	36
2.9	Präparation von Embryos.....	38
2.10	Bestimmung des Gehaltes an β -Tubulin	38
2.10.1	Extraktion der Proteinfraktion	38
2.10.2	Elektrophorese	39
2.10.3	Western Blot und immunologischer Nachweis.....	40
2.10.4	Coomassie-Färbung	41
2.10.5	Quantifizierung der Signalintensitäten	41
2.11	Bestimmung der Gehalte an 4C-Nuclei mittels Flowcytometry	42

2.12	Bestimmung der Expression der Isocitratlyase.....	43
2.12.1	Probenmaterial für die Bestimmung der Isocitratlyase.....	43
2.12.2	Herstellung des internen Standards	43
2.12.2.1.	Herstellung der Inserts.....	44
2.12.2.2.	Herstellung des Vektors	45
2.12.2.3.	Ligation von Insert und Vektor	45
2.12.2.4.	Transformation	45
2.12.2.5.	PCR-Colony-Screening	46
2.12.2.6.	Vermehrung des positiven Klons	46
2.12.2.7.	Linearisierung der Plasmid-DNA	46
2.12.2.8.	In-vitro Transkription des internen Standards	46
2.12.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus Rohkaffee	48
2.12.4	RT-Reaktion	49
2.12.5	Analyse mittels Elektrophorese	49
2.12.6	Geräte für die Bestimmung der ICL-Expression	50
2.13	Wassergehaltsbestimmungen.....	51
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	51
3.1	Bestimmung des physiologischen Status der Kaffeesamen während der Aufbereitung.....	52
3.1.1	Reifestadium der Kaffeekirschen	52
3.1.2	Keimungsprozesse in Rohkaffeebohnen.....	53
3.1.2.1	Die Bestimmung der Zellzyklusaktivität	53
3.1.2.1.1	Bestimmung des Anteils an 4C-Nuclei in Kaffeeembryos	54
3.1.2.1.2	Bestimmung des β -Tubulin-Gehaltes	56
3.1.2.2	Die Expression von keimungsspezifischen Enzymen	59
3.1.3	Auftreten eines Stressmetabolismus	62
3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen zum physiologischen Status der Kaffeesamen während der Aufbereitung	66
3.2	Bestimmung des physiologischen Status der Kaffeesamen während der Lagerung.....	68
3.2.1	Bestimmung der Vitalität.....	68
3.2.2	Bestimmung der Aktivität von hydrolytischen Enzymen	70
3.2.2.1	Endo- β -mannanase	72
3.2.2.2	β -Mannosidase.....	74
3.2.2.3	α -Galactosidase	76
3.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen zum physiologischen Status der Kaffeesamen während der Lagerung	78
3.3	Bestimmung wichtiger Aromavorstufen während Aufbereitung und Lagerung von Rohkaffee.....	79
3.3.1	Freie Aminosäuren	79
3.3.1.1	Aminosäuregehalte während der Aufbereitung von Rohkaffeebohnen.....	80
3.3.1.2	Aminosäuregehalte während der Lagerung von Rohkaffeebohnen	82
3.3.2	Lösliche niedermolekulare Kohlenhydrate.....	85
3.3.2.1	Zuckergehalte im Verlauf der Aufbereitungen.....	88
3.3.2.2	Zuckergehalte während der Lagerung von Rohkaffees	96
3.3.3	Sensorische Eigenschaften.....	104
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen wichtiger Aromavorstufen während Aufbereitung und Lagerung von Rohkaffee	108
4.	ZUSAMMENFASSUNG	111
5.	LITERATUR	113
6.	ANHANG.....	127

Abkürzungen

APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ACN	Acetonitril
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
D	in Abbildungen: Dry (trocken aufbereiteter Kaffee)
DDT	Dithiothreitol
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ferm.	fermentiert
GABA	γ -Aminobuttersäure
HPAEC-PAD	Hochauflösende Anionenaustauschchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
M	molar $\hat{=}$ [mol/L]
MeOH	Methanol
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NTP	Nucleosid-5'-triphosphat
OD	Optische Dichte
OPA	o-Phthaldialdehyd
P	in Abbildungen: Pergamino (im Parchment gelagerter nass aufbereiteter Kaffee)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
S	in Abbildungen: semi (semi-dry aufbereiteter Kaffee)
ss	engl.: <i>strictly soft</i>
SSA	Sulfosalicylsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
TBS	Trisbuffered saline
TM	Trockenmasse
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
ü.N.N.	über normal Null ($\hat{=}$ über dem Meeresspiegel)
x g	multipliziert mit g, wobei g in diesem Fall die Gravitationskraft darstellt
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Umdrehungen
W	in Abbildungen: Wet (nass aufbereiteter Kaffee)

1. Einleitung

Kaffee ist ein Getränk, das überall auf der Welt verbreitet ist. Hergestellt wird es aus den gerösteten Samen des Kaffee-Strauches (*Coffea spec.*). Es gibt viele unterschiedliche Arten der Gattung *Coffea*, die zur Familie der Rubiaceae gehören. Wirtschaftlich sind vor allem zwei Arten von Bedeutung [1]: Etwa 80 % der gesamten Kaffee-Welterzeugung gehen auf den Arabica-Kaffee (*Coffea arabica* L.) zurück. Die verbleibenden 20 % sind hauptsächlich so genannte Robusta-Kaffees (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner). Für den Weltmarkt eher unbedeutend sind die darüber hinaus produzierten geringen Mengen Liberica Kaffees (*Coffea liberica* Hiern.). Arabica-Kaffees werden zwischen dem 23. Grad nördlicher und dem 25. Grad südlicher Breite angebaut. Robusta-Kaffees werden nur innerhalb der ersten zehn Breitengrade nördlich und südlich des Äquators kultiviert. Wenn die Kaffeebäume nicht – wie in der Kulturhaltung üblich – zurück geschnitten werden, können sie mehrere Meter hoch werden [2]. In den Kaffeeplantagen werden die Kaffeebäume in der Regel als Büsche oder kleine Bäume kultiviert.

1.1. Die Bedeutung von Kaffee als Wirtschaftsgut

Die Welt-Kaffeeproduktion stieg zwischen 1993 und 2003 von 5,4 Millionen Tonnen auf über sieben Millionen Tonnen, dies entspricht etwa 120 Millionen Sack à 60 kg [1]. Kaffee wird heute in mehr als 70 Staaten auf einer Fläche von etwa 130 Millionen Hektar angebaut; dies entspricht etwa 8 % der weltweit kultivierten Fläche. Kaffee ist für diese Staaten ein sehr wichtiges Exportgut. In vielen Kaffeeproduktionsländern sind so genannte Subsistenzwirtschaften vorherrschend, d.h. Kaffee wird als *Cash Crop* angebaut und die übrigen landwirtschaftlichen Produkte (mit Ausnahme des Zuckers) dienen primär der Deckung des Eigenbedarfes.

In Deutschland lag der Pro-Kopf-Verbrauch von Rohkaffee 2001 bei 159,2 Litern, was Kaffee zum beliebtesten Getränk der Deutschen macht. Auf Platz zwei folgte Bier mit 123,1 Litern vor Mineral- und Tafelwässern mit 110,2 Litern [2].

Im Jahr 2003 betrug der Rohkaffeeimport 532.030 t, den größten Anteil davon lieferte mit etwa 30 % Brasilien, danach folgen Vietnam mit etwa 13 % und Kolumbien mit etwa 11 % [1].

1.2. Rohkaffeeaufbereitung und Kaffeequalität

Die Qualität eines Kaffees wird durch viele im Anbaugebiet wirksame Parameter bestimmt. Zu nennen sind hier vor allem die Wachstumsbedingungen: Neben ausreichender Wasser- und Nährstoffversorgung im Boden sind es in erster Linie die klimatischen Voraussetzungen (wie Temperatur, Sonnenstunden, Regenmenge usw.), die geographische Lage sowie das Reifestadium bei der Ernte. So stellen Hochlandkaffees – vermutlich durch das verlangsamte Wachstum [3] – einen deutlich

höherwertigeren Kaffee dar, als Kaffees, die aus Lagen unterhalb etwa 1000 m ü.N.N. stammen. Auch die Kaffeenacherntebehandlung hat einen starken Einfluss auf die resultierende Kaffeequalität. Nach der Aufbereitung beeinflussen auch die Transport- und die Lagerungsbedingungen nachhaltig die Qualität [4, 5].

1.2.1 Kaffeeernte und Kaffeeaufbereitung

Da Kaffeeernte und Aufbereitung einen tiefgreifenden Einfluss auf die Kaffeequalität haben, wird im Folgenden ein kurzer Überblick über die verschiedenen Arten der Rohkaffeeproduktion gegeben. Der Schwerpunkt soll auf dem bedeutenderen Arabica-Kaffee liegen, wobei die in Brasilien üblichen Methoden im Vordergrund stehen. Dabei werden zum Teil die in der Kaffeebranche üblichen englischen und brasilianischen Begriffe ergänzend verwendet, da die deutsche Terminologie auf diesem Gebiet oft unzureichend ist.

Abhängig von Anbaugebiet werden selektiv ausschließlich reife Kaffee Früchte gepflückt, oder es wird die nicht selektive *Stripping*-Methode¹ angewendet. Da die reifen Früchte, die so genannten Kaffeekirschen, nach zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden verarbeitet werden, ist auch die vor Ort übliche Aufbereitungsmethode für die Erntemethode mitbestimmend. In trockenen Gebieten, in denen es zumindest in der Erntezeit verlässlich trocken ist und die Wasservorkommen begrenzt sind, wird der Kaffee trocken aufbereitet. Für die trockene Aufbereitung wird in der Regel nach der *Stripping*-Methode geerntet. In Brasilien werden hierbei häufig zusätzlich Erntemaschinen eingesetzt. Die geernteten Früchte werden meist ohne weitere Behandlung auf einer Terrasse zum Trocknen ausgelegt (Sonnentrocknung: etwa zwei bis drei Wochen). In einer Mühle werden schließlich das getrocknete Fruchtfleisch (Exo- und Mesokarp) samt Hornschale (Endokarp $\hat{=}$ Parchment) entfernt. Übrig bleiben die freien Samen, der so genannte grüne Kaffee oder auch Rohkaffee. In diesem Zustand (Restfeuchte < 12 %) sind die auch als Bohnen bezeichneten Kaffeeseamen transport- und lagerfähig.

In Gebieten mit häufigen oder unberechenbaren Niederschlägen kann der Kaffee nicht trocken aufbereitet werden. In diesen Gebieten kommt zwingend die nasse Aufbereitung zur Anwendung. Darüber hinaus kann auch in niederschlagsärmeren Gebieten die nasse Aufbereitung zum Einsatz kommen, sofern genügend Frischwasser (beispielsweise aus Stauseen) zur Verfügung steht. Für die nasse Aufbereitung werden meistens ausschließlich reife Kaffeekirschen geerntet (*Picking*). Alternativ kann das aus *Stripping* resultierende heterogene

¹ Alle Bohnen eines Kaffeebaumes werden unabhängig vom Reifegrad am selben Tag geerntet (→ *Picking*-Methode, bei der nur vollreife rote Kaffeekirschen vom einzelnen Baum "gepickt" werden).

Erntegut während der Nacherntebehandlung entsprechend nachsortiert werden. Dazu werden die Kaffeekirschen durch eine Waschanlage (brasilianisch: *Lavador*) gespült. In dieser werden durch Flotation Fremdmaterialien wie Blätter und kleine Äste sowie im Wasser aufschwimmende Früchte – so genannte *Floater* (engl.) oder *Bojas* (brasil.) – abgetrennt. *Floater* sind Bohnen bzw. Früchte deren spezifisches

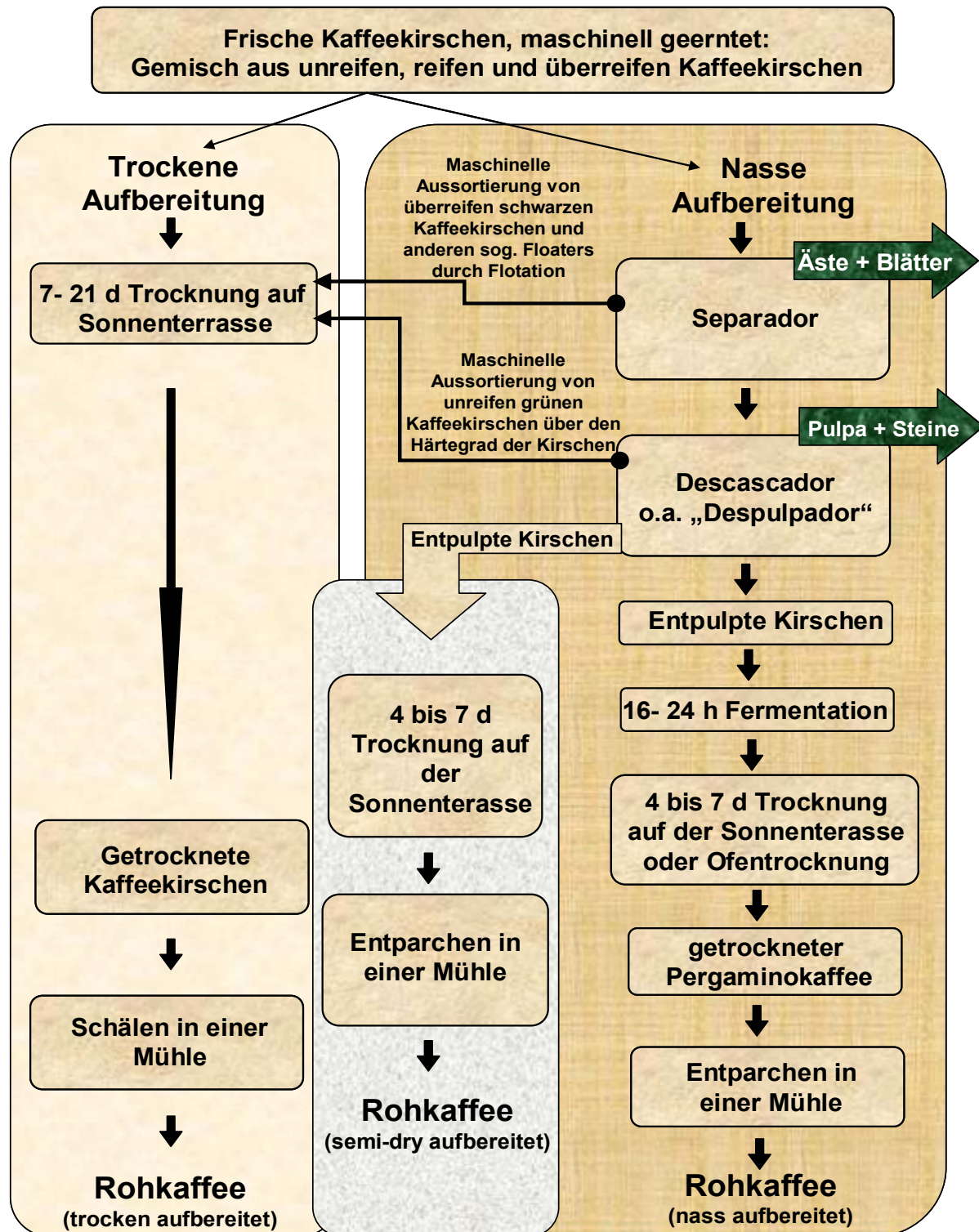


Abb. 1: Kaffeeaufbereitungsvariationen auf den *Fazendas Conquista* und *Capoerinha* der *Ipanema Agrícola Ltda.* in Alfenas, Brasilien.

Gewicht geringer ist als das von gesunden frischen, weil sie z.B. schon am Baum (teilweise) getrocknet sind. Weitere Gründe hierfür sind leere Kammern in den Samenanlagen, sowie von Insekten befallene Früchte. Die im *Lavador* absinkenden grünen und roten Kaffeekirschen gelangen anschließend mit dem Wasserstrom in einen Pulper (brasilianisch: *Descascador* oder *Despulpador*). Hier wird das Fruchtfleisch (die Pulpa) mechanisch größtenteils entfernt. Kirschen deren Fruchtfleisch zu hart ist, um abgequetscht zu werden (z.B. unreife grüne Kirschen), können den Pulper nicht passieren und werden vorab aus dem Prozess entfernt. Nach der mechanischen Fruchtfleischentfernung verbleiben schleimige Reste des Fruchtfleisches am Endokarp (Parchment), das den Samen umgibt. Um diesen Schleim zu entfernen, werden die Bohnen nun in einen Fermentationstank gespült. Hier verbleiben sie in der Regel für etwa 16 – 36 h, in einigen Fällen kann diese Zeitspanne aber auch bis zu 100 h betragen [6, 7]. In dieser Zeit werden die Schleimreste abgebaut. Nach Fermentationsende und dem darauf folgenden Abwaschen des Schleims wird dieser Pergamentkaffee² für drei bis fünf Tage ebenfalls auf einer Sonnenterrasse oder alternativ in mechanischen Trocknern getrocknet (Restfeuchte < 12 %). Während früher der Pergamentkaffee erst im Zielhafen von der Hornschale befreit wurde [8], geschieht das heute meistens bereits im Anbaugebiet [6].

In Brasilien kommt zusätzlich noch eine intermediäre Methode zwischen der nassen und trockenen Aufbereitung zur Anwendung, das so genannte semi-dry-Verfahren. Dabei werden die Kaffeekirschen analog der nassen Aufbereitung entpulpt, dann jedoch nicht fermentiert, sondern samt den auf dem Parchment verbleibenden Pulparesten sofort in der Sonne getrocknet. Eine Übersicht über die auf den *Fazendas* der *Ipanema* in Brasilien üblichen Aufbereitungsvariationen und ihren schematischen Ablauf ist in Abb. 1 gegeben.

1.2.2 Verschiffung und Lagerung von Rohkaffee

Streng genommen bezieht die Kaffeenerntebehandlung die Verschiffung und Lagerung des Rohkaffees mit ein. Der geschälte Rohkaffee wird meist innerhalb weniger Monate nach der Ernte exportiert, da die meisten Kaffeeröster bestrebt sind, möglichst frisches und damit qualitativ hochwertiges Material zu verarbeiten. Die Verschiffung erfolgt traditionell in Jutesäcken à 60 kg bis 70 kg, jedoch ist seit den 1960er Jahren der Transport in Containern auf dem Vormarsch (*bulk shipment*) [4]. Zwar ist Rohkaffee wesentlich unempfindlicher gegenüber mikrobiellem Verderb als das frische Erntegut, dennoch stellen Verschiffung und Lagerung sensible Phasen im Hinblick auf Qualitätserhaltung dar. Die Lagerungsdauer kann mehrere Jahre

² Pergamentkaffee (im Folgenden auch Parchmentkaffee (engl.) oder Pergaminokaffee (brasil.) genannt): Kaffee, der noch vom Endokarp (Hornschale) umgeben ist und so eine natürliche Schutzhülle gegen mechanische Beschädigungen hat.

betragen, jedoch sind auch bei guter Lagerung, nach spätestens einem Jahr erste Qualitätseinbußen festzustellen.

1.2.3 Einflüsse von Nacherntebehandlung und Lagerung auf die Qualität

Die nass aufbereiteten Kaffees werden auch "gewaschene Kaffees" genannt und so von den "ungewaschenen" Kaffees aus der trockenen Aufbereitung unterschieden. Die nasse Aufbereitung ist deutlich kürzer als die trockene. Generell sind bei der nassen Aufbereitung, bedingt durch die kürzere Trockenzeit, die Risiken für mikrobiellen Verderb reduziert.

Nass und trocken aufbereitete Kaffees unterscheiden sich später im Getränk vor allem durch die Charakteristika eines vollen Körpers bei trocken aufbereiteten [9] und mehr Säure bei nass aufbereiteten Kaffees [10]. Auch der semi-dry- (oder *Descascados*-) Kaffee liefert eine besondere Qualität. Diese ist zwischen der Qualität der nass und trocken aufbereiteten Kaffees angesiedelt [9]. Noch vor wenigen Jahren wurden Unterschiede in nass und trocken aufbereiteten Kaffees ausschließlich auf die oben aufgeführten aufbereitungsspezifischen unterschiedlichen Ernte- und Sortierungsmethoden bezogen [11, 12]. Ohne Zweifel sind dies wesentliche Faktoren; daneben wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch das Potenzial der lebendigen Kaffeesamen auf spezifische Bedingungen der Aufbereitung zu reagieren, eine qualitätsbestimmende Rolle spielen muss [13]. Dieses wurde später auch experimentell untermauert, denn auch wenn identisches Ausgangsmaterial parallel nass und trocken aufbereitet wurde, ergaben sich die genannten Geschmacksunterschiede; gleichzeitig wurden Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung der zugrunde liegenden Rohkaffeebohnen festgestellt [14]. Weiterführende Untersuchungen zeigten einen stoffwechselbedingten Anstieg des Gehaltes an GABA (γ -Aminobuttersäure) durch eine trockene Aufbereitung der Kaffeesamen auf [15, 16]. Es ist nicht auszuschließen, dass neben diesen die freien Aminosäuren betreffenden Stoffwechselvorgängen auch weitere physiologische Veränderungen mit den unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden einhergehen.

Auch während der Lagerung von Rohkaffees wurden Veränderungen in der Zusammensetzung der Kaffeebohnen festgestellt. Überlang (mehr als 10 Monate) gelagerte Kaffees weisen häufig eigentümliche Fehlparomen (engl.: *off-notes*) auf. Als Hauptursache derartiger Qualitätseinbußen gelten oxidative Veränderungen an Chlorogensäuren und Kaffeeölen, die bei längerer und besonders bei unsachgemäßer Lagerung nicht zu vermeiden sind [17-22].

Von diesen Prozessen unabhängig ist bei überlagerten Rohkaffees bzw. den daraus resultierenden Röstkaffees außerdem oft eine deutliche "Verflachung" der Tassenqualität festzustellen, d.h. die für die jeweiligen Provenienzen typischen Geschmacksmerkmale des Kaffeegetränkes - vor allem im Bereich der

Spitzenqualitäten - lassen mit zunehmender Lagerung des Rohkaffees nach. Während die Ursachen für die eingangs genannten *off-notes* (engl.) oder Fehlparomen prinzipiell bekannt sind, liegen diejenigen für die kontinuierlichen "Verflachungsprozesse" weitgehend im Dunkeln. Die wenigen Hinweise über diesbezügliche Veränderungen im Rohkaffee betreffen vor allem die löslichen Kohlenhydrate [23, 24]. Die Rohkaffeesamen behalten während der Lagerung ihre Keimfähigkeit nur für begrenzte Zeit [25, 26]. In früheren Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Vitalität und Keimfähigkeit und den genannten Qualitätseinbußen diskutiert [27, 28].

1.2.4 Die Bildung des Kaffeeröstaromas

In Deutschland kommt Kaffee fast ausschließlich in seiner gerösteten Form bzw. direkt als Getränk oder Extrakt in den Handel. Die wichtigsten Qualitätsmerkmale des Produktes sind dann Farbe, Aroma und Geschmack. Die hierfür maßgeblichen Stoffe bilden sich während des Röstvorgangs aus im Rohkaffee vorhandenen Vorstufen. Von den über 800 im Kaffeeröstaroma identifizierten Verbindungen [29] geht die Mehrzahl auf *Maillard*-Reaktionen³, also Reaktionen zwischen Aminosäuren und Zuckern bzw. deren Folgereaktionen, zurück [30, 31].

Beim Rösten von Kaffee sind grundsätzlich drei Phasen zu unterscheiden: Erstens die Trocknungsphase, in der die Bohne den Großteil des noch vorhandenen Wassers verliert und Temperaturen von etwa 100°C erreicht. Während der sich anschließenden Röstphase steigt die Temperatur der Bohnen auf etwa 170°C - 230°C [9] an. In dieser zweiten Phase finden die *Maillard*-Reaktionen statt, die neben anderen für die Aromaausprägung des resultierenden Kaffees sorgen. Die dritte Phase ist das so genannte *Quenchen*. Dabei handelt es sich um einen beschleunigten Abkühlungsprozess mit Wasserdampf. Er beschleunigt das Abkühlen der Bohnen, um eine Verkohlung des Röstguts zu verhindern.

Die in dieser Arbeit untersuchten Aromavorstufen (lösliche niedermolekulare Zucker und freie Aminosäuren) sind Ausgangsstoffe der während des Röstprozesses ablaufenden *Maillard*-Reaktion. Diese Reaktion wird eingeleitet durch die Bildung eines N-Glykosids (siehe Abb. 2).

³ *Maillard*-Reaktionen sind benannt nach Louis Camille Maillard, der schon 1912 als erster umfangreiche Versuche zu der beim Erhitzen von zucker- und aminosäurehaltigen Gemischen auftretenden Bräunung durchführte.

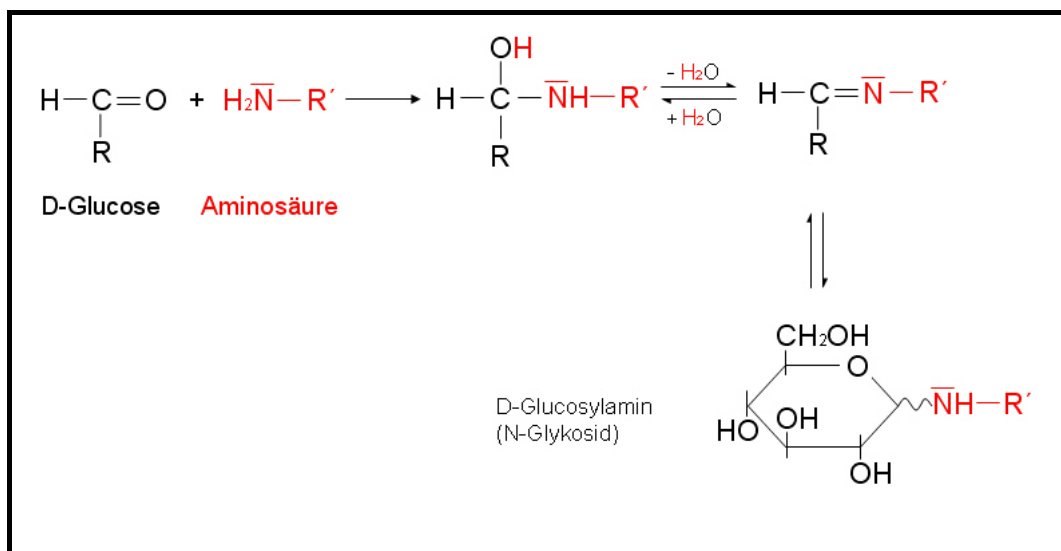


Abb. 2: N-Glykosidbildung über Addition an die Carbonylgruppe mit anschließender Wasserabspaltung zum Imin und Cyclisierung zum Glykosylamin (verändert nach BELITZ und GROSCH[32]).

Die N-Glykoside aus Aldosen können dann unter anderem über die so genannte *Amadori-Umlagerung* zu 1-Amino-1-desoxyketosen weiter reagieren. Währenddessen liefern die Ketosen nach *Heyns-Umlagerung* 2-Amino-2-desoxyaldosen (siehe Abb. 3).

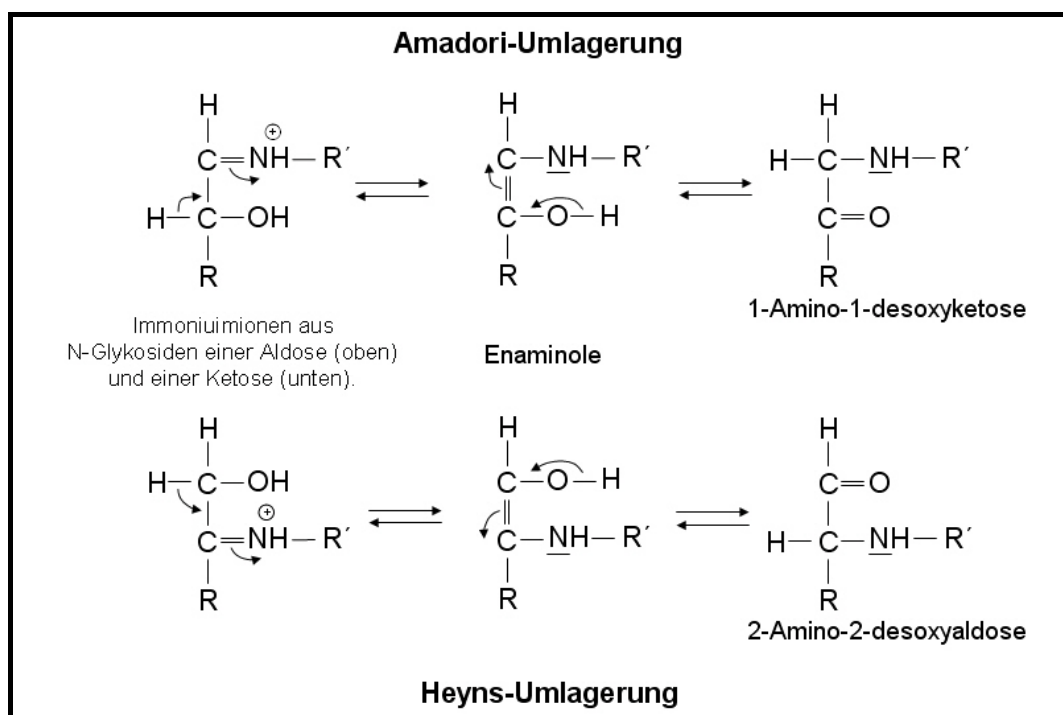


Abb. 3: Amadori- und Heyns-Umlagerung von Glucosylaminen (verändert nach BELITZ und GROSCH [32]).

Die dabei entstandenen Verbindungen können im Anschluss weiter zu so genannten Desoxyosonen abgebaut werden. Diese liefern als reaktive α -Dicarbonylverbindungen im Verlauf der *Maillard-Reaktion* viele Folgeprodukte (siehe Abb. 4).

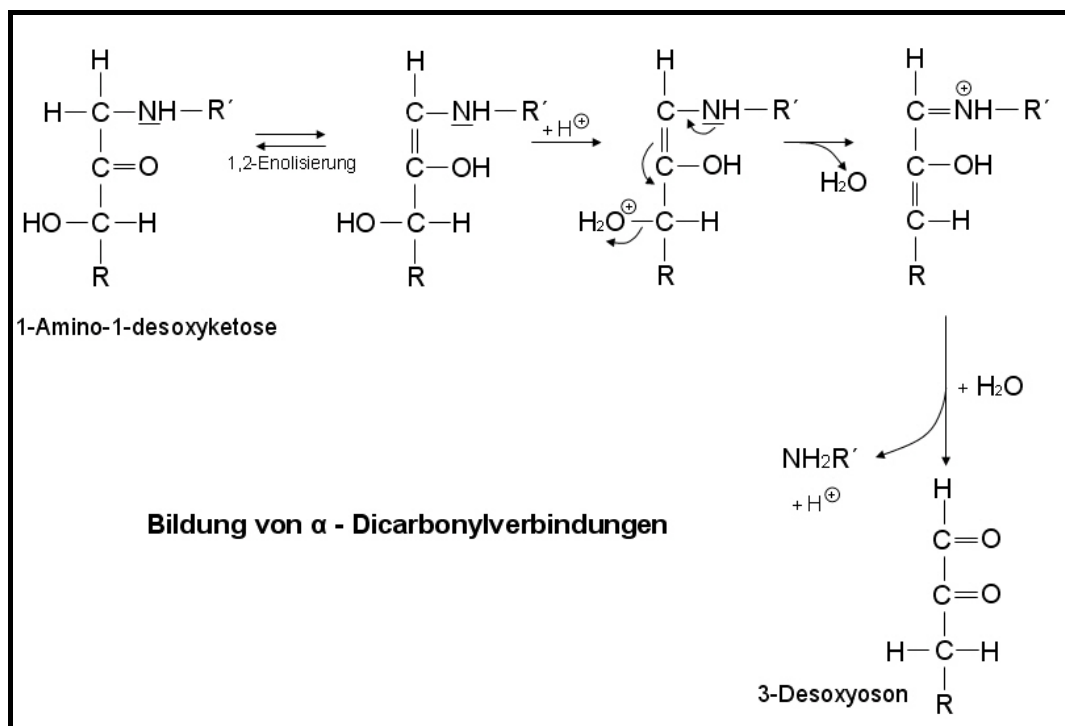


Abb. 4: Bildung von α -Dicarbonylverbindungen am Beispiel eines 3-Desoxyosones aus einer 1-Amino-1-desoxyketose (verändert nach BELITZ und GROSCH [32]). Statt der hier dargestellten 1,2-Enolisierung kann ebenso eine 2-3 Enolisierung stattfinden, welche analog zum 1-Desoxyoson führt.

Bei der Bildung der Desoxyosone geht die Aminoverbindung wieder aus der Reaktion hervor und steht wieder für eine N-Glykosidbildung zur Verfügung. Aminosäuren verbinden sich während der Röstung aber auch unter Wasserabspaltung in einer als *Strecker*-Abbau bekannten Reaktion mit α -Dicarbonylverbindungen. Dabei erfolgt unter Decarboxylierung eine Transaminierung. Nach Wasseraufnahme entstehen letztendlich ein Strecker-Aldehyd und ein Aminoketon (siehe Abb. 5).

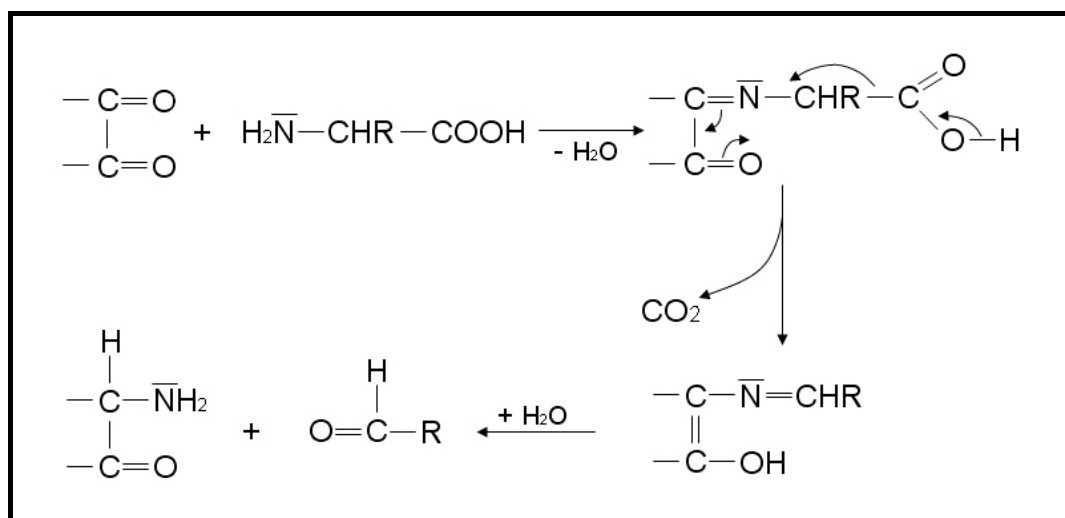


Abb. 5: Bildung von aromarelevanten (*Strecker*-) Aldehyden und Aminoketonen über den *Strecker*-Abbau (verändert nach BELITZ und GROSCH [32]).

Hieraus resultieren später Furane, Furanone, verschiedene Pyrazine sowie Aldehyde wie Methional, Acetaldehyd und Methylbutanal [33].

Die freien Aminosäuren einerseits [34-47] und die löslichen Kohlenhydrate andererseits [23, 44, 48-63] sind im Kaffee aufgrund ihres Einflusses auf das Kaffeeröstaroma bereits häufig Gegenstand der Forschung gewesen. Einige weitere Arbeiten widmeten sich dieser Thematik mit besonderer Beachtung von Aufbereitung oder Lagerung [14-16, 24, 64-70]. Dabei offenbarten diese Arbeiten große Schwankungen in den Gehalten an freien Aminosäuren und freien Zuckern. Eine Erklärung dafür wäre, dass in kaum einer dieser Untersuchungen identisches Ausgangsmaterial für die unterschiedlichen Aufbereitungen eingesetzt wurde.

Für die vorliegende Arbeit soll daher der Erstellung des Probenmaterials besondere Aufmerksamkeit gewidmet werden. Wie bereits ausgeführt wird auf den meisten Plantagen klimatisch oder wirtschaftlich bedingt nur eine der beiden traditionellen Aufbereitungsmethoden angewandt. Soll festgestellt werden, ob die beiden verschiedenen Aufbereitungsmethoden einen spezifischen Einfluss auf die Kaffeequalität haben, so müssen trocken und nass aufbereitete Kaffees miteinander verglichen werden, die aus identischem Ausgangsmaterial hergestellt wurden. Nur so können andere Einflussfaktoren wie unterschiedliche Varietät, Provenienz oder Reife ausgeschlossen werden. Daher ist es erforderlich, jeweils vollreife Kaffee Früchte desselben Erntetages einer bestimmten Parzelle parallel für beide Aufbereitungen zu verwenden.

1.3. Fragestellung

In dieser Arbeit soll zunächst untersucht werden, inwieweit sich physiologische Unterschiede in verschiedenen aufbereiteten Rohkaffeesamen der gleichen Charge nachweisen lassen. Darüber hinaus soll geprüft werden ob, und in welchem Umfang, sich aus unterschiedlichen Aufbereitungen oder aus einer Lagerung unter definierten Bedingungen über einen langen Zeitraum, stoffliche und/oder sensorische Unterschiede ergeben. Gibt es während Aufbereitung und Lagerung von Rohkaffee Veränderungen im physiologischen Status der Kaffeebohnen oder von Aromavorstufen, speziell löslichen Zuckern und freien Aminosäuren?

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit soll erstmals untersucht werden, wie sich Physiologie und Inhaltsstoffe von Rohkaffeesamen identischer Qualität und Herkunft von der vollreifen Frucht über die Aufbereitung bis hin zu zwei Jahre gelagerten Bohnen verändern, um so zu erfassen, welche endogenen Faktoren die speziellen Qualitätsausprägungen von nass und trocken aufbereiteten Rohkaffees bestimmen.

Ziel der Arbeit ist es, die physiologischen und chemischen Unterschiede, die durch Aufbereitung und Lagerung im Rohkaffee entstehen, auf zwei Ebenen zu erfassen:

Zunächst sollen die jeweiligen Stoffwechselsituationen bestimmt werden, in denen sich die Kaffeesamen während Nacherntebehandlung und Lagerung befinden. Dafür müssen die physiologisch und biochemisch relevanten Prozesse identifiziert und in ihrem Ablauf charakterisiert werden. Zu überprüfen sind hierbei vor allem Keimungsvorgänge in den Samen, die durch die Expression keimungsspezifischer Enzyme sowie durch Wiederaufnahme des Zellzyklus im Embryo dokumentiert werden sollen. Des Weiteren soll jüngerem Hinweisen auf einen während der Trocknung auftretenden Stressmetabolismus nachgegangen werden [16]. Schließlich soll durch begleitende Vitalitätsbestimmungen der mögliche Einfluss von *postmortem* Veränderungen auf die Qualität der Rohkaffees erfasst werden. Dadurch soll ein Überblick über den physiologischen und biochemischen Status sowohl der frischen Rohkaffeebohne als auch während der Nacherntebehandlung und der Lagerung gewonnen werden, um so die Ursachen für die unterschiedlichen Qualitätsausprägungen der verschieden aufbereiteten Rohkaffees aufzuklären und die pflanzenphysiologischen Hintergründe aufzuzeigen.

Auf der Ebene der stofflichen Zusammensetzung sollen die Gehalte an freien Aminosäuren und niedermolekularen Kohlenhydraten untersucht werden. Diese Stoffe sind wichtige Vorstufen des Kaffeeröstaromas und tragen so maßgeblich zu Aroma und Geschmack des resultierenden Kaffeegetränks bei. Des Weiteren können sie auch als Markersubstanzen für Stoffwechselvorgänge fungieren und so zusätzlich eine Einordnung der metabolischen Vorgänge in ein Gesamtkonzept unterstützen. Schließlich soll mit der Bestimmung hydrolytischer Enzyme untersucht werden, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen ihrer Aktivität und dem Gehalt an löslichen Zuckern besteht.

2. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden das verwendete Probenmaterial und die angewandten Bestimmungsmethoden beschrieben.

2.1 Pflanzenmaterial

Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich Kaffee der Art Arabica (*Coffea arabica* L.) verwendet. Das Probenmaterial für Feldversuche in Brasilien bestand aus einer Mischung der Varietäten *Acaiá* und *Mundo Novo*, wobei *Acaiá* eine Weiterentwicklung der Varietät *Mundo Novo* darstellt und sich nur geringfügig von letzterer unterscheidet [71].

Das Probenmaterial für die Laboraufbereitungen stammte aus Mexiko (Varietät *Caturra*), aus Tansania (Varietät *KP345*) und aus dem Gewächshaus des Botanischen Gartens der TU Braunschweig sowie aus dem Tropengewächshaus in Witzenhausen, zugehörig der Universität Kassel.

2.2 Probenherstellung

Zur Herstellung von Rohkaffeeproben sind im Juli 2002 Musteraufbereitungen auf der zur *Ipanema Agricola Industria Ltda.* gehörenden *Fazenda Conquista* in Alfenas im brasilianischen Bundesstaat Minas Gerais durchgeführt worden. Diese Plantage bietet wegen ihrer Größe - sie ist bezogen auf den Baumbestand, die größte Kaffeeplantage der Welt - und ihrer umfangreichen Produktion verschiedener Kaffeesorten die Möglichkeit, die verschiedenen Aufbereitungsmethoden simultan durchzuführen.



Abb. 6: Kaffeefelder der *Ipanema Agricola Industria Ltda.*

Die *Fazenda Conquista* ist eine der wenigen Kaffeeplantagen Brasiliens, die nicht nur die trockene Aufbereitung, sondern auch die nasse Aufbereitung im großen Maßstab routinemäßig durchführt und somit ideale Voraussetzungen für die Feldversuche bot.

Um den Verlauf der Veränderungen der Inhaltsstoffe während der Kaffeenacherntebehandlungen erfassen zu können, war es nötig, auch Proben mittels Laborfermentationen in Braunschweig herzustellen. Dieses konnte mit frischen vollreifen Kaffeekirschen realisiert werden, welche direkt nach der Ernte aus Tansania (Arabica Kaffee der Varietät *KP345*, von der Kaffeefarm der Firma TCHIBO) bzw. Mexiko (Arabica Kaffee der Varietät *Caturraí*, Kaffeefarm der Neumann-Gruppe) per Flugzeug nach Deutschland transportiert worden waren. Idealerweise wurden diese Bohnen am Morgen geerntet, mittags nach Deutschland geflogen und bereits abends in Braunschweig einer Modellfermentation unterzogen.

2.2.1 Kaffeeaufbereitungen

In dieser Arbeit werden in erster Linie die zwei grundsätzlich unterschiedlichen Aufbereitungsmethoden verglichen: die nasse und die trockene Methode. Diese wurden einerseits im Feld, vor Ort in Brasilien, auf einer Kaffeepflanzung durchgeführt und andererseits, wie eben beschrieben im Labor, anhand von direkt nach der Ernte nach Deutschland importierten Bohnen.

2.2.1.1 Musteraufbereitungen im Labor

Für die Musteraufbereitungen im Labor war es vor allem wichtig, reifes Probenmaterial direkt nach der Ernte aus dem jeweiligen Anbaugebiet nach Braunschweig zu schaffen. Die Proben für die Musteraufbereitungen wurden an den Internationalen Flughäfen von Hamburg (Proben aus Mexiko) oder Frankfurt (Proben aus Tansania) in Empfang genommen. Die Zeit zwischen Ernte und Beginn der Modellfermentation lag zwischen 18 und 36 h. Das frische Material wurde mit Hilfe von Eisbeuteln in Styroporbehältern in der Regel bei 4°C versandt.



Abb. 7: Erlenmeyerkolben mit entpulpten Kaffebohnen während einer nassen Laboraufbereitung.

Für die trockene Aufbereitung wurden die Kaffeekirschen sofort in die vorbereiteten Trockenschränke bei 35°C gelegt. Für die nasse Aufbereitung wurden die Samen umgehend manuell entpulpt und bei Raumtemperatur 18 bis 24 h

fermentiert. Hierzu wurden die Samen in Erlenmeyerkolben unter Zugabe von Leitungswasser bei Zimmertemperatur in einer Schichtdicke von etwa 5 – 10 cm inkubiert. Die Wasserhöhe über den Samen betrug etwa 0,5 bis 1 cm. Im Laufe der Fermentation wurde zwei- bis dreimal das Wasser gewechselt. Für die jeweiligen Frischproben wurde von den unbehandelten Früchten umgehend das gesamte Perikarp (also inklusive Parchment) entfernt. Die so gewonnenen Samen wurden unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.2 Modellaufbereitungen in Brasilien

Für die großen Musteraufbereitungen in Brasilien waren eine gute Planung sowie die Abstimmung mit der normalen Produktion unerlässlich. So war gewährleistet, dass an einem Tag eine große Charge eines Feldes geerntet und an der Fazenda Conquista früh morgens angeliefert wurde. Mit Unterstützung einer großen Zahl von Hilfskräften für die Sortierung der reifen Kaffeekirschen für die trockene Aufbereitung konnte die Vergleichbarkeit von nasser und trockener Aufbereitung sichergestellt werden.

Bei der nassen Aufbereitung werden durch Flotationsanlagen (brasilianisch: *Lavadores*, siehe Abb. 8) im Wasser oben treibende Bohnen (überreife Bohnen, Bohnen mit Luftkammern durch Schädlinge - z.B. den Kaffebohner - oder durch Fehlentwicklungen während des Wachstums) abgetrennt.



Abb. 8: In *Lavadores* werden alle schwimmenden Fremdstoffe und Kaffeekirschen (*Floaters*) abgetrennt.

Anschließend werden harte, grüne Früchte aussortiert, sodass die mechanischen Entschleimer (*Pulper*, siehe Abb. 9) nur die weichen, roten Kirschen erfassen. Bei maschineller Ernte gelangen aber Bohnen unterschiedlichster Reifegrade in die Verarbeitung. Daher mussten für eine trockene Aufbereitung – genau wie bei der nassen Aufbereitung – unreife und überreife Früchte sowie Früchte mit Schädlingsbefall manuell aussortiert werden. Deshalb wurde sofort bei

Anlieferung damit begonnen, für die trockene Musteraufbereitung reife rote Früchte auszusortieren.

Die vollreifen, roten Früchte wurden auf dem *Patio* (brasilianisch: Trocknungsterrasse) der *Fazenda* in einem abgetrennten Bereich zum Trocknen



Abb. 9: In Pulpern werden nur vollreife rote Früchte entschleimt.



Abb. 10: Trocknung bei den Musteraufbereitungen auf dem *Patio* der *Ipanema*.

ausgelegt (siehe Abb. 10). Die Bohnen der nassen Aufbereitung wurden nach einer etwa 18-stündigen Fermentation in einem Fermentationstank, in dem die Schleimschicht komplett abgebaut wurde, ebenfalls auf dem *Patio* zum Trocknen ausgelegt. Um eine ungleichmäßige Trocknung sowie mikrobiellen Verderb zu verhindern, mussten die anfangs sehr feuchten nass aufbereiteten Bohnen, die noch von der Hornschale umgeben sind, ebenso wie die Kaffeekirschen häufig gewendet werden. Nachts wurden die Trocknungsfelder mit Planen abgedeckt, damit die Bohnen und Früchte nicht durch Tautropfen wieder angefeuchtet werden konnten. Der Zeitpunkt, an dem die Bohnen fertig getrocknet und bereit zum Schälen sind, wurde von dem erfahrenen Vorarbeiter der Trocknungs-Terrasse festgestellt. Die Trocknungsphasen der beiden Aufbereitungen sind sehr unterschiedlich. Während bei der nassen Aufbereitung die Bohnen nur vom Parchment (= Hornschale) eingeschlossen sind, sind die Bohnen der trockenen Aufbereitung zusätzlich von der Kirschhaut, der Pulpa und der Schleimschicht umgeben. Dies führt zu einer bedeutend langsameren Trocknung. So waren die nassen Bohnen bereits nach vier bis fünf Tagen trocken, während die Bohnen der trockenen Aufbereitung erst nach

mehr als zwei Wochen die Restfeuchte von 12 % erreicht hatten und geschält werden konnten.

Bei den Aufbereitungen in Brasilien wurde zusätzlich das semi-dry Verfahren in die Untersuchungen mit einbezogen. Dabei wurden entpulppte Parchment-Bohnen ohne Fermentation auf die Trocknungs-Terrasse aufgebracht. Dieser Kaffee trocknet ähnlich schnell wie der fermentierte, nass aufbereitete.

2.3 Lagerungsbedingungen des Rohkaffees

Die gewählten Lagerungsbedingungen werden zunächst erläutert, danach wird die Lagerung vorgestellt.

2.3.1 Erörterung der Lagerungsbedingungen

Samen werden, was ihre Lagerfähigkeit angeht, nach ROBERTS (1973) [72] grundsätzlich in zwei Kategorien eingeteilt: Einerseits orthodoxe Samen, die sich sowohl durch eine hohe Trocknungstoleranz (Wassergehalt kann bis auf 3 – 5 % des Frischgewichtes sinken) auszeichnen als auch längere Lagerung bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt überstehen können, andererseits rekalzitrannte Samen, die kaum trockenstolerant sind (der Wassergehalt für die Lagerung muss typischerweise konstant über 40 % des Frischgewichts des Samens liegen). Rekalzitrannte Samen sterben bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt ab, da sich Eiskristalle bilden, die die Integrität der Zellen zerstören. *Coffea arabica* Samen nehmen eine intermediäre Stellung zwischen orthodoxen und rekalzitrannten Samen ein [73, 74], da sie einerseits frostempfindlich sind und andererseits eine moderate Trocknung überstehen. Durch die Trocknung wird aber die Lebensfähigkeit der Samen nicht verlängert.

Es ist seit langem bekannt, dass es bei überzogener Trocknung der Kaffeesamen zu nachteiligen Veränderungen für dessen Lebensfähigkeit kommt. So kommt es bei einer Trocknung der Samen auf 7 % absoluten Wassergehalt (anstatt wie üblich auf etwa 12 %) zu Verlusten der Lebensfähigkeit der Samen [75]. Nach einer Trocknung auf 4 – 5 % Wassergehalt sterben sogar die meisten Samen ab [74]. HUXLEY (1964) kam bei einer Lagerung von gewaschenen Robusta Kaffees in Holzasche zu Ergebnissen, die auf eine Vitalitätsverlängerung durch Lagerung im Parchment schließen lassen [76]. Darüber hinaus können auch überhöhte Temperaturen sowohl während der mechanischen Trocknung [77] als auch während der Sontentrocknung [6] den Samen schädigen. Dieses wurde sowohl bei den Feldversuchen in Brasilien als auch bei den Laboraufbereitungen vermieden, sodass die Vitalität nach der Aufbereitung und zu Beginn der Lagerung aller Samen bei über 95 % lag (siehe Kapitel 3.2).

2.3.2 Gewählte Lagerungsbedingungen

Die Lagerung des Rohkaffees erfolgte unter definierten und konstanten Bedingungen. Die Temperatur blieb durch Lagerung in einem auf 20°C temperiertem Raum im Keller des Instituts für Pflanzenbiologie während der gesamten Versuchsdauer konstant. Als Lagerungsbehälter fungierten im Hinblick auf die Nutzung umgebaute Glasaquarien. In diesen wurde die relative Luftfeuchtigkeit so eingestellt, dass sie mit dem Wassergehalt des Rohkaffees von etwa 11 % abs. Feuchte im Gleichgewicht steht. Dies war bei etwa 60 % rel. Luftfeuchte gewährleistet [78] (siehe Abb. 11).

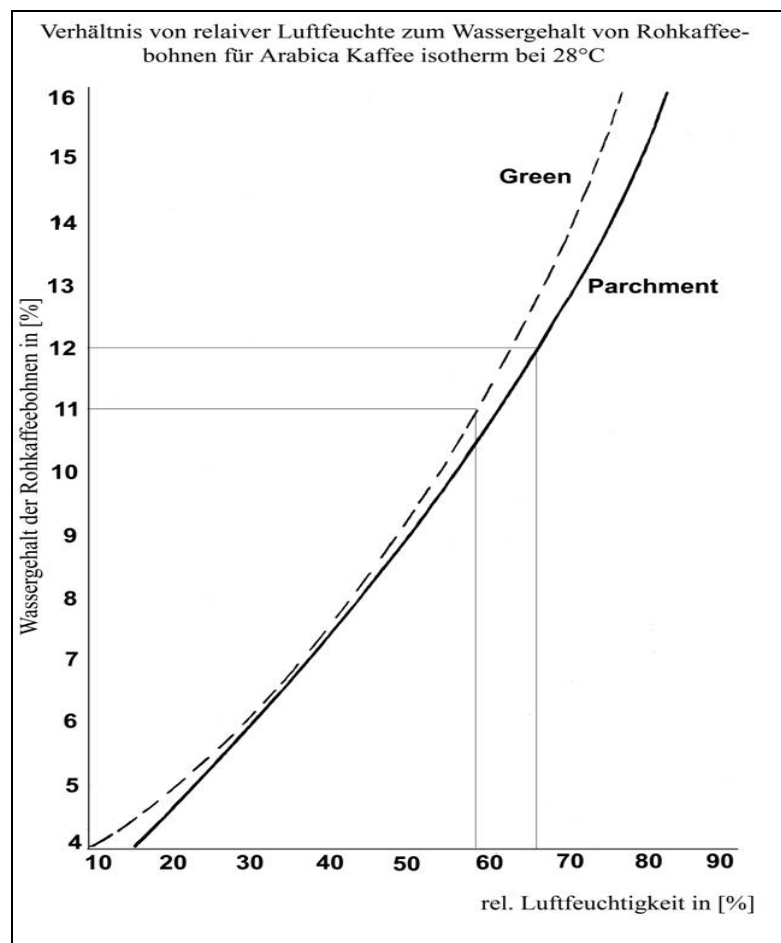


Abb. 11: Kombinierte Adsorptions- und Desorptionsisotherme von Rohkaffee (verändert nach STIRLING [78]).

Um dies zu erreichen, wurden die Proben über einer gesättigten Ammoniumnitratlösung gelagert, deren Wasserdampfdruck bei 25°C etwa 60 % rel. Feuchte entspricht [79].



Abb. 12: Lagerung der Rohkaffeeproben in geschlossenen Glasaquarien über gesättigter Ammoniumnitrat-Lösung.

Die Kontrolle der Raumtemperatur erfolgte per Thermometer, die angestrebte relative Luftfeuchte wurde durch Hygrometer in den Glasaquarien überwacht (siehe Abb. 12).

2.4 Bestimmung der sensorischen Eigenschaften

Für die sensorische Beurteilung der unterschiedlich gelagerten Rohkaffees wurden die Proben von zwei verschiedenen *sensoric panels* verkostet. Zuerst in sehr frischem Zustand direkt nach Ende der Aufbereitungen in Brasilien auf der Fazenda von den Verkostern der *Ipanema*. Die zweite, umfangreichere Verkostung fand nach 12-monatiger Lagerung im Dezember 2003 in Deutschland statt. Durchgeführt wurde sie vom Industriepartner *TCHIBO, Röstfrisch GmbH* in Hamburg.



Abb. 13: Verkostung auf der der *Ipanema Agricola Industria Ltda.*

Die Proben waren turnusmäßig jeweils direkt nach der Probennahme an die *TCHIBO Röstfrisch GmbH* geschickt worden. Dort wurden sie umgehend geröstet und bis zur Verkostung bei -20°C gelagert. Den simultan durchgeführten Verkostungen lag folgendes Bewertungsschema zugrunde:

Tab. 1: Bewertungsschema zur Verkostung der eingelagerten Kaffeeproben.

Fülle/Säure/Aroma	Code	Fülle/Säure/Aroma	Code
Sehr voll	13	mittel / voll	7
	12		6
voll / sehr voll	11	Mittel	5
	10		4
Voll	9	leicht / mittel	3
	8		2
		leicht /dünn	1

2.5 Bestimmung der Vitalität der Kaffeesamen

Ein ganz entscheidender Marker für den physiologischen Status der Samen ist deren Vitalität. Eine verlässliche Methode, die Vitalität von Zellen zu testen, ist der TTC-Test [80, 81]. Intakte, vitale Zellen nehmen das TTC auf und reduzieren es; wobei ein roter Farbstoff entsteht.

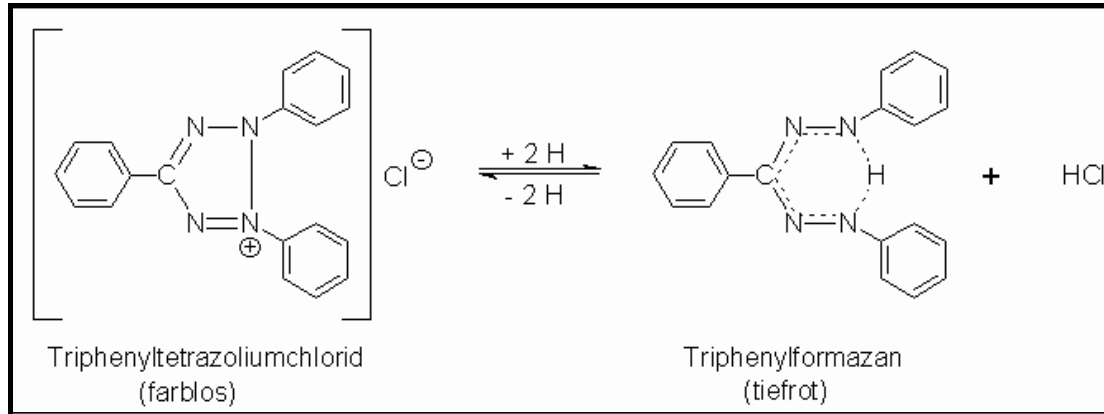


Abb. 14: Nachweisreaktion auf vitale Zellen in Pflanzengewebe mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC).

Abgestorbenes Gewebe verfügt über keinerlei Reduktionskraft und weist folglich keine Rotfärbung auf. Die Vitalität der Samen wurde wie folgt ermittelt: Isolierte Kaffeesamen wurden 24 h in Leitungswasser gequollen. Anschließend wurde mit einem Skalpell eine ca. 1 mm dünne Scheibe aus den Samen geschnitten, und zwar so, dass sowohl Endosperm als auch Embryo quer getroffen wurden. Diese Scheiben wurden dann über Nacht in 1 %-iger Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)-Lösung (in 50 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,6) inkubiert.



Abb. 15: Abbildungen eines Samens mit vitalem Embryo und Endosperm (links) und eines Samens in dem beide Teile bereits abgestorben sind und beim TTC-Test nicht mehr rot angefärbt werden (rechts).

Anschließend wurden die Präparate aus der Lösung genommen und visuell auf Rotfärbung geprüft. Als vital wurden solche Samen eingestuft, bei denen sowohl Embryo als auch Endosperm die erforderliche Rotfärbung aufwiesen. Es wurden jeweils 20 Samen pro Charge und Monat auf ihre Vitalität getestet.

2.6 Bestimmung von hydrolytischen Enzymen

Als Grundlage für die Bestimmung der unterschiedlichen hydrolytischen Enzyme diente jeweils Enzymrohhomogenat, das wie folgt hergestellt wurde: Rohkaffeepulver wurde unter flüssigem N₂ in einer Retsch[®] MM200 Kugelmühle zu einem sehr feinen Pulver gemahlen. Dieses tief gefrorene Pulver wurde anschließend direkt in 5 mL Homogenisationspuffer (pH 5,0) überführt und im Ultra Turrax homogenisiert (dreimal je 10 s). Anschließend wurde die Probe für 15 Min. bei 4°C und 30.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Enzymrohhomogenat zur Bestimmung eingesetzt.

2.6.1 Endo- β -mannanase

Die Bestimmung von Endo- β -mannanasen erfolgte bislang standardmäßig über Viskosimetrie. Als Substrat wurde das (Galacto-) Mannan aus Guarkernmehl oder aus Carobsamen verwendet; die Aktivität wurde über die Abnahme der Viskosität des Substratgemisches ermittelt.

Heute erfolgt die Bestimmung der Endo- β -Mannanaseaktivität zumeist mit Hilfe eines Geldiffusionstests [82, 83]. Hierbei wird durch die Endo- β -Mannanaseaktivität das polymere Galactomannansubstrat hydrolysiert. Der Farbstoff Kongorot bindet spezifisch an lange 1 \rightarrow 4 β -verknüpfte D-glucopyranoside, 1 \rightarrow 3 β -verknüpfte D-glucane und Galactoglucomannane [84]. Die Bindung des Farbstoffs wird durch Endoenzyme, die die Länge der Oligomere stark verkürzen, herabgesetzt, während Exoenzymaktivität nur einen geringen Einfluss hat [82]. Da der Farbstoff besser an die unverdauten Polymere bindet, kann der Wirkungsbereich des Enzyms durch Zugabe eines geeigneten Indikators sichtbar gemacht werden. Die Enzymaktivität ist proportional zur Fläche des Gels, in dem die pH-Veränderung festgestellt werden kann.

Zur Herstellung der Platten wurden 0,05 % (w/v) Galactomannan-Substrat (Guar) in Inkubationspuffer (0,1 M Zitronensäure, 0,5 M Natriumphosphat, pH 5,0) gelöst, auf 95 °C erhitzt, 20 Min. gerührt und dann 15 Min. bei 4°C und 15.000 x g zum Klären zentrifugiert. Zu dieser Lösung wurden 0,8 % (w/v) Agarose gegeben und aufgekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurden jeweils 30 mL zum Gießen der einzelnen Platten in den Petrischalen verwendet. Nach dem Verfestigen der Platten wurden je 10 Proben-Löcher mit 3 mm Durchmesser in die Platten gestanzt. Für die einzelnen Bestimmungen wurden je 10 μ L des Rohhomogenates eingesetzt.

2.6.2 β -Mannosidase

β -Mannosidasen spalten endständige Mannosylreste von unterschiedlichen Heterosiden (z.B. Anthocyane, Glucosinolate, Phenol-Glucoside) ab. Da die Bestimmung der gebildeten Produkte häufig problematisch ist, wird bei routinemäßigen β -Mannosidase-Tests mit p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranosid ein

artifizielles Substrat verwendet, das von fast allen β -Mannosidasen hydrolysiert wird. Das entsprechende Hydrolyseprodukt, das p-Nitrophenol, liegt im Alkalischen als Phenolat vor und weist eine sehr hohe Extinktion auf ($\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$, $\epsilon_{400} = 18.650 \text{ L / mol cm}$). Da das Substrat p-Nitrophenyl- β -mannopyranosid bei 400 nm so gut wie keine Absorption zeigt, kann aus der Extinktionszunahme bei 400 nm auf die gebildete Menge p-Nitrophenol pro Zeiteinheit und damit auf die β -Mannosidase-Aktivität geschlossen werden.

Zur Bestimmung der β -Mannosidase-Aktivität wurde ein Gemisch aus Enzym und Substrat in McIlvaine-Puffer (Gesamt-Volumen 2,5 mL) in kurzen Reagenzgläsern bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Substrates gestartet. Die Endkonzentration von p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranosid betrug 2 mM (Standardinkubationsansatz). Nach 10 Min wurden jeweils 0,5 mL der Inkubationslösung in 3,5 mL 70 mM Na_2CO_3 -Lösung überführt. Anschließend wurde die Extinktion bei 400 nm bestimmt.

Reagenzien: McIlvaine-Puffer pH 5,6 (100 mM Zitronensäure wird mit 200 mM Na_2HPO_4 -Lösung auf pH 5,6 eingestellt),
p-Nitrophenyl- β -D-mannopyranosid (10 mM in McIlvaine-Puffer)
 β -p-NPM, 70 mM Na_2CO_3 -Lösung.

2.6.3 α -Galactosidase

Die Bestimmung der α -Galactosidase-Aktivität erfolgte analog der β -Mannosidase, jedoch mit p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid als Substrat und anschließender photometrischen Messung der p-Nitrophenol-Konzentration (400 nm). Als Enzymprobe fungiert - wie bei der Bestimmung der β -Mannosidase - die entsprechend der oben dargestellten Beschreibung erstellte Enzymprobe.

Reagenzien: McIlvaine-Puffer pH 5,6 (100 mM Zitronensäure wird mit 200 mM Na_2HPO_4 -Lösung auf pH 5,6 eingestellt),
p-Nitrophenyl- α -D-glucopyranosid (10 mM in McIlvaine-Puffer)
 α -p-NPG, 70 mM Na_2CO_3 -Lösung.

2.7 Bestimmung der freien Aminosäuren

Die Bestimmung der freien Aminosäuren einschließlich der γ -Aminobuttersäure erfolgte mit Hilfe der HPLC. Dabei wurden die Aminosäuren zunächst extrahiert und vor der Injektion mit OPA derivatisiert. Die Derivate wurden mittels Fluoreszenzdetektion bestimmt. Diese Methode nach ROTH [85] wurde am Institut für Pflanzenbiologie in den letzten Jahren modifiziert und ist seit einigen Jahren etabliert. Diese Methode erfasst ausschließlich primäre Amine. Bei der Extraktion der Aminosäuren aus den proteinreichen Kaffeesamen war sicherzustellen, dass direkt nach der Zerstörung der Zellkompartimente durch Mörsern oder Einfrieren keine

enzymatischen Reaktionen (insbesondere Protease-Aktivitäten) stattfinden können, die aufgrund von Proteolysen Ergebnisse verfälschen könnten.

2.7.1 Vorbereitung des Probenmaterials

Proteolytische Aktivität im Zuge der Aufbereitung wurde durch folgendes Vorgehen verhindert: Die Bohnen wurden sofort nach der Probennahme mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. In diesem Zustand wurden sie in einer *Retsch*[®] *MM200* Kugelmühle eine halbe Minute lang zu einem gleichmäßig feinen tiefgekühlten Pulver gemahlen. Anschließend wurden den Proben gefriergetrocknet. Als Basis für die folgenden Analysen diente jeweils das homogenisierte gefriergetrocknete Pulver von 72 gemörserten äußerlich intakten Rohkaffeebohnen.

2.7.2 Extraktion

Die erstellten resultierenden Rohkaffeeproben wurden in Zentrifugenröhrchen genau eingewogen (~ 500 mg). Um alle Proteine zu fällen bzw. zu denaturieren und so enzymatische Reaktionen weiterhin unmöglich zu machen, wurden sie mit SSA-Lösung (4 % w/v) versetzt. Als interner Standard wurden zu jeder Probe 50 µl einer 0,16 mM Norvalin-Lösung gegeben. Die Proben wurden 20 s im Ultra Turrax homogenisiert und bei 4000 U/Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet weitere dreimal auf gleiche Weise nachextrahiert. Die Überstände wurden in einem 100 mL Messkolben vereinigt und auf das Endvolumen aufgefüllt. Um störende lipophile Substanzen abzutrennen, wurde die erhaltene Lösung 2 h bei 4°C belassen. Dabei setzte sich eine leicht abzutrennende Fettschicht ab. Ein Aliquot der verbliebenen fettfreien Probe wurde anschließend bei 13000 U/Min und 4°C 10 Min. zentrifugiert und nach Filtration durch Watte für die anschließende Derivatisierung und HPLC-Bestimmung eingesetzt.

2.7.3 Derivatisierung

Unmittelbar vor der HPLC-Analyse erfolgte eine automatisierte Derivatisierung in einem *MIDAS* Autosampler der Firma *Spark Holland*. Die Derivatisierung erfolgte nach folgendem Schema:

Tab. 2: Derivatisierungsschema der Aminosäurebestimmung:

Schritt Nr.	Aktion	Menge	Reagens
1	Add	750 µl	Probe
2	Add	280 µl	1 N NaOH
3	Mix	999 µl	-
4	Add	375 µl	OPA-Reagens
5	Mix	999 µl	-
6	Injektion	20 µl	-

Die Injektion erfolgte exakt 2 Min. nach Zugabe des OPA-Derivatisierungsreagens.

Das OPA-Derivatisierungsreagens setzte sich wie folgt zusammen:

50 mg OPA

50 µl Mercaptoethanol

1,2 mL MeOH

11,2 mL Boratpuffer (0,2 M)

Als Interner Standard diene eine 0,16 mmol/L Norvalin-Lösung (4 %ig in SSA).

2.7.4 HPLC-Bestimmungsparameter

Die HPLC-Bestimmung erfolgte unter Verwendung einer RP-Säule und eines komplexen Fließmittelgradienten.

Säule:	20 cm Nucleosil, C18 100-5
Flussrate:	1,3 mL/Min.
Fließmittel:	A:
	1800 mL Natriumacetatpuffer pH 6,1
	100 mL MeOH
	100 mL ACN
	20 mL Tetrahydrofuran
	B:
	400 mL ACN
	400 mL MeOH
	200 mL Natriumacetatpuffer pH 6,1

Der Fließmittelgradient hatte folgenden Aufbau:

Tab. 3: Aufbau des Fließmittelgradienten der Aminosäurebestimmung:

Zeit (Min.)	Anteil Fließmittel A (%)	Anteil Fließmittel B (%)
0	100	0
12	100	0
27	90	10
39	74	26
44	74	26
48	60	40
63	50	50
68	0	100
75	0	100

Geräteparameter:

Autosampler:

MIDAS, Spark, Holland

Gradientenpumpe:

Techlab

Detektor:

Shimadzu RF 551-Fluoreszenzdetektor

Anregung:

334 nm (Excitation)

Emmision:

425 nm

2.8 Bestimmung der löslichen niedermolekularen Kohlenhydrate

Für die Extraktion der Kohlenhydrate war darauf zu achten, dass kein enzymatischer Abbau der vorliegenden Zucker und keine Hydrolyse der polymeren Kohlenhydrate im Zuge der Extraktion erfolgen konnten.

2.8.1 Vorbereitung des Probenmaterials

Jeweils 72 (6 mal 12 pro Mahlvorgang) äußerlich intakte Bohnen wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und in einer *Retsch*[®] *MM200* Kugelmühle mit Edelstahlkugeln zu einem sehr feinen Pulver vermahlen. Anschließend wurde dieses Rohkaffeepulver gefriergetrocknet.

2.8.2 Extraktion

Vom gefriergetrockneten Rohkaffeepulver wurden Aliquots (etwa 50 mg) in ein 10 mL Zentrifugenröhrchen genau eingewogen. Nach Zugabe von 5 mL heißem Ethanol (80°C, 80 %ig, zur Deaktivierung der Enzyme) und 100 µl einer Melezitose-Lösung (7 mmol/L) als internen Standard wurde homogenisiert (Ultra Turrax, 20 s). Anschließend wurde das Homogenat 10 Min. in einem 80°C heißen Ultraschallbad belassen. Dann wurde es bei 4000 U/Min 5 Min. zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde ein weiteres Mal wie beschrieben extrahiert. Es folgte eine zweimalige Extraktion mit 60 %igem Ethanol (RT). Auf diese Weise wurde sichergestellt, dass alle niedermolekularen Zucker vollständig extrahiert worden sind (weitere Extraktionsschritte brachten keinerlei erhöhte Werte). Alle Extrakte wurden vereinigt und bei 80°C im Evaporator zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit 5 mL Reinstwasser (Reinstwasseranlage: *ELGA* Maxima, Widerstand > 18 MΩ*cm) sowie einer Spatelspitze PVPP versetzt. Zum erneuten Lösen wurde ein Laborschüttler (Vortexer) verwendet. Anschließend wurden weitere 5 mL Reinstwasser zugegeben und die Probe für 5 Min. in einem Ultraschallbad belassen. Danach wurde die Lösung quantitativ in einen 50 mL Messkolben überführt. Nach dem Auffüllen wurde ein Aliquot abgenommen. Das PVPP wurde durch Zentrifugation (10 Min. 4000 U/Min) weitestgehend abgetrennt. Der Überstand über eine Festphasenextraktion (Sep-Pak C18-Kartusche, *Waters*) gereinigt.

2.8.3 Ionenchromatographische Bestimmung

Das klare Eluat der Festphasenextraktion wurde für die Analyse der niedermolekularen Kohlenhydrate eingesetzt. Die Bestimmung erfolgte über eine Hochauflösende Anionenchromatographie mit gepulster amperometrischer Detektion (HPAEC-PAD). Für die Analyse der vergleichsweise hochkonzentrierten Saccharose wurde die Probe 1:4 mit Reinstwasser im Autosampler verdünnt. Die Quantifizierung erfolgte über die Chromeleon-Software mit internem Standard und externer Kalibrierung.

HPAEC-PAD-Bestimmungsparmeter:

Säule: *DIONEX[®] CarboPac PA20 Säule*
 Gerät: *DIONEX[®] BIO-LC*
 Pumpe: *DIONEX[®] GS 50 Gradient Pump mit Borat Trap*
 Vorsäule: *Amino Trap*
 Autosampler: *DIONEX[®] AS 50 Autosampler mit AS 50 Thermal Compartment (Säulen-Temperatur: 30°C)*
 Detektor: *DIONEX[®] ED 50 Elektrochemischer Detektor mit Goldelektrode (Folienelektrode)*
 Detektion: *gepulste Amperometrie*
 Waveform: *Waveform Time = 0.00, Potential = 0.10*
Waveform Time = 0.20, Potential = 0.10,
Integration = Begin
Waveform Time = 0.40, Potential = 0.10,
Integration = End
Waveform Time = 0.41, Potential = -2.00
Waveform Time = 0.42, Potential = -2.00
Waveform Time = 0.43, Potential = 0.60
Waveform Time = 0.44, Potential = -0.10
Waveform Time = 0.50, Potential = -0.10

Tab. 4: Fließmittelgradient der HPAEC:

Injektionsvolumen: 20 µl
 Fluss: 0,5 mL/Min
 Fließmittelgradient: siehe Tab. 4
 Steuerung und Datenaufnahme: Chromeleon[®]
 Software Version 6.40

Zeit [Min.]	NaOH [mmol/L]
0	17
9,5	12,5
9,51	28
17,5	28
17,51	108
29,01	108

2.8.4 Chromatogramme und Kalibrierungen der HPAEC

Mit der verwendeten Methode können in einem einzelnen Lauf 11 Zucker und der interne Standard Melezitose gut nebeneinander bestimmt werden. Eine Verfälschung durch die im Alkalischen eventuell stattfindende *Lobry de Bruyn-van Ekenstein*-Umlagerung [86] konnte nicht nachgewiesen werden.

In den Rohkaffeeproben wurden nicht alle der im Standard enthaltenen Zucker wieder gefunden. Melezitose ist als interner Standard zugesetzt worden. Bei Rhamnose, Raffinose und Stachyose wurde eine lineare Kalibrierfunktion verwendet. Bei Arabinose, Galactose, Glucose, Mannose, Saccharose, Fructose und dem internen Standard Melezitose wurde eine quadratische Kalibrierfunktion der Peakflächen festgestellt (Abbildungen der Kalibrierfunktionen siehe Anhang, Abb. 68 - Abb. 77).

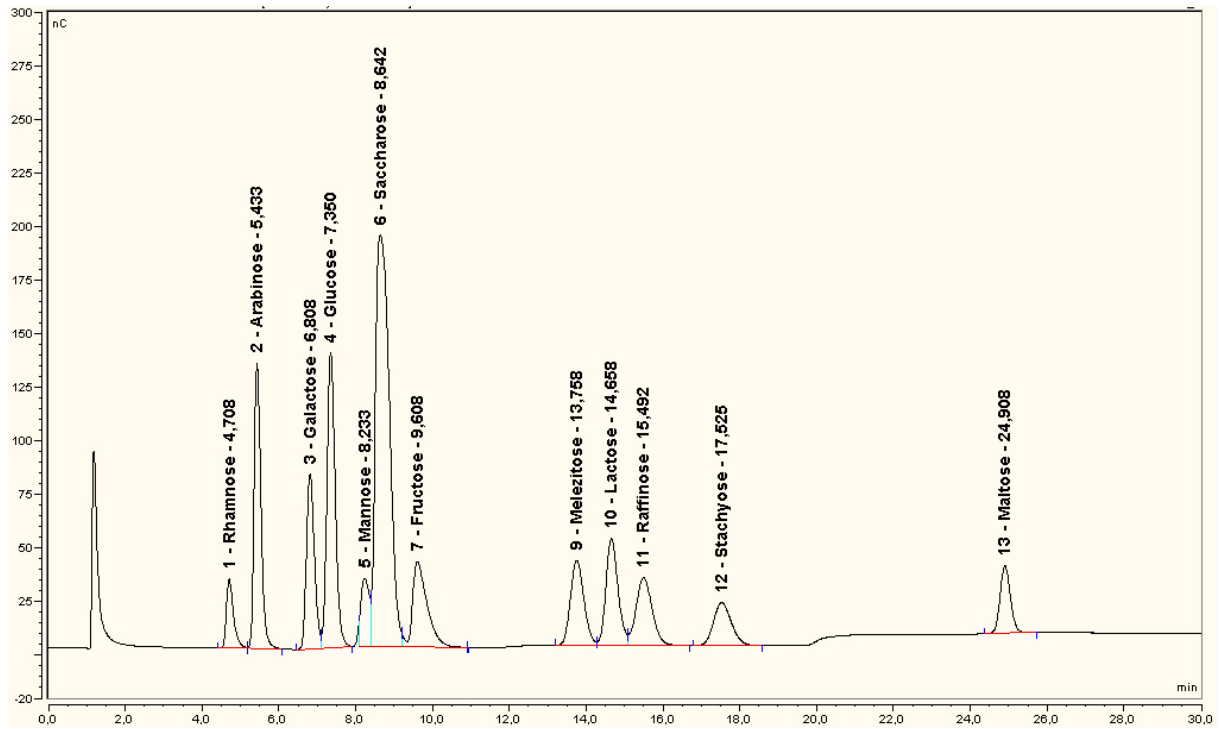


Abb. 16: Chromatogramm eines Zucker-Mischstandards.

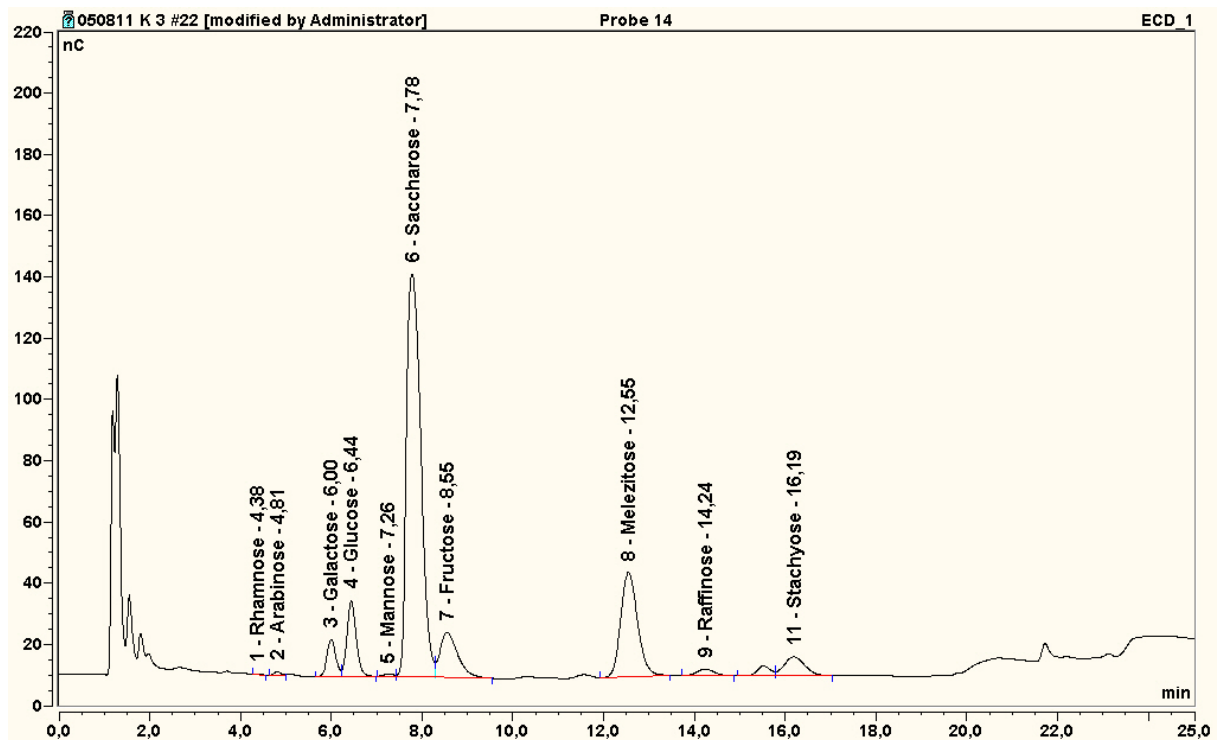


Abb. 17: Chromatogramm einer unverdünnten frischen Rohkaffeeprobe (*Coffea arabica* L. Var. *Acaiá*, Mexiko).

2.9 Präparation von Embryos

Zur Präparation von Embryos wurden sowohl frische Samen als auch Samen aus den frühen Stadien der Aufbereitung verwendet. Hierzu wurden mit Hilfe eines Skalpells die Embryos vorsichtig aus dem umgebenden Endosperm herausgelöst. Wenn sie nicht direkt zur Bestimmung eingesetzt wurden (z.B. für die Bestimmung der 4C-Nuclei), wurden sie anschließend mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.10 Bestimmung des Gehaltes an β -Tubulin

Die Bestimmung der jeweils in den Samen vorhandenen Menge an β -Tubulin erfolgte über denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE). Dabei wurde auf der Methode von LÄMMLI [87] aufgebaut. Diese Bestimmung gliedert sich in Extraktion, elektrophoretische Auftrennung und immunologischen Nachweis (*Western Blot*). Dabei wird zunächst ein β -Tubulin spezifischer Antikörper eingesetzt, der seinerseits mit Hilfe eines sekundären Antikörpers nachgewiesen wird.

2.10.1 Extraktion der Proteinfraction

Zunächst wurden aus den Kaffeebohnen mit einem Skalpell die Embryos herauspräpariert und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Analyse wurden die Embryos in einem 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Plastikpistill unter flüssigem Stickstoff vorgemörsert. Anschließend wurden zu 150 μ L Denaturierungspuffer (62,5 mM Tris/HCl, 2 % SDS, 15 mg/mL DTT, 7 % Glycerin, pH 6,8) 15 μ L einer Protease-Inhibitoren Lösung (1 Tablette Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini (*Roche*®) in 1,5 ml Denaturierungspuffer) und je 15 Embryos gegeben und mit dem Plastikpistill homogenisiert. Danach wurde die Probe 5 Min. bei 95°C im Heizblock erhitzt, um alle Proteine zu denaturieren. Daraufhin wurden die 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß 5 Min. bei 10.000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 10 μ L Bromphenolblaulösung (gesättigt in 0,1 %igem EtOH) versetzt. Diese Lösung wurde für die Elektrophorese eingesetzt.

2.10.2 Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden Gele verwendet, die aus einem Trenngel mit einem darüber liegenden Sammelgel bestehen. Die Herstellung erfolgt nach folgendem Schema:

Tab. 5: Herstellung der Gele für die für PAGE aus den Stammlösungen

Trenngel (10 %)			Sammelgel (4 %)	
Acrylamidlösung	4,2 mL		Acrylamidlösung	0,55 mL
Trenngelpuffer	6,3 mL		Sammelgelpuffer	0,83 mL
Aqua dest.	5,8 mL		Aqua dest.	4,15 mL
SDS (10 %)	170 µL		SDS (10 %)	67 µL
APS (10 %)	130 µL		APS (10 %)	67 µL
TEMED (10 %)	130 µL		TEMED (10 %)	35 µL
			Bromphenolblau	15 µL

Es wurden folgende Stammlösungen verwendet:

Acrylamid-Stammlösung:	40 g Acrylamid + 1,2 g Bisacrylamid ad 100 mL
Trenngelpuffer:	1 M Tris/HCl, 250 mL; pH 8,8
Sammelgelpuffer:	1 M Tris/HCl, 250 mL; pH 6,8
APS:	10 % (w/v); 0,2 g ad 2 mL H ₂ O dest. (täglich frisch)
TEMED:	10 % (v/v); 0,1 mL + 0,9 mL H ₂ O dest.
Elektrodenpuffer:	3 g Tris, 14,4 g Glycin ad 1 L H ₂ O dest. (pH 8,3)

Die verwendete Elektrophorese-Apparatur war eine Mini-Protean II Dual Slab Cell; BioRad. Zum Beladen wurden die Taschen mit je 10 µL Probelösung bzw. Standardlösung gefüllt.

Elektrophoresebedingungen:	<u>Sammelgel</u>	Laufzeit: ~0,5 h
	Spannung:	40 V
	<u>Trenngel</u>	Laufzeit: ~1 h
	Spannung:	100-140 V

2.10.3 Western Blot und immunologischer Nachweis

Das entwickelte Gel wurde aus der Elektrophoresehalterung (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell; BioRad) gelöst und 30 Min. in einer großen Petrischale mit Transferpuffer äquilibriert. Eine Ecke des Gels wurde zur Markierung abgeschnitten. Zum Blotten wurde ein im Folgenden schematisch dargestelltes Blot-Sandwich gepackt:

Plus Pol / Anode
Schwamm
4 Whatman-Papiere
Nitrocellulosemembran
Trenngel
4 Whatman-Papiere
Schwamm
Minus Pol / Kathode

Abb. 18: Darstellung der Schichten des PAGE-Sandwichs

Blotting Parameter:

Spannung: 25 V

Blotting-Zeit: 75 Min.

Anschließend wurde die Membran kurz an der Luft getrocknet (zur Überprüfung des Proteintransfers wurde mit Ponceau-S-Lösung (konz.) gefärbt, anschließend durch 5-maliges Waschen mit TBS_{Tween20} wieder komplett entfärbt).

Es folgten verschiedene Inkubationen

- Blockieren (BSA-Lösung 1 %ig, 1 h)
- Inkubieren mit Antikörper 1 (1 h)
- Waschen mit TBS (3 Mal, je 5 Min.)
- Inkubieren mit Antikörper 2 (1 h)
- Waschen mit TBS (4 Mal, je 5 Min.)
- Waschen mit dest. H₂O
- Färben mit Färbelösung (5 bis max. 30 Min., bis Banden deutlich sichtbar)
- Abstoppen mit 20 mM Na-EDTA-Lösung (ca. 2 Min. waschen)
- Spülen mit dest. H₂O, Trocknen der Membran (15 Min. RT)
- Anschließend wurden die Membranen mit einem Laminiergerät eingeschweißt.

Verwendete Lösungen und Antikörper:

TBS:
 8 g/L NaCl
 0,2 g/L KCl
 3 g/L Tris
 auf pH 8,0 eingestellt
 Zugabe von 0,5 % Tween 20

Transferpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glycin, auf pH 8,7 eingestellt. Zugabe von 10 %igem MeOH
Antikörper 1:	30 mL 1:4 verd. TBS-Puffer Zugabe von 3 µL monoclonal Anti-β-Tubulin Antikörper (Clone TUB 2.1; Sigma)
Antikörper 2:	30 mL 1:4 verd. TBS-Puffer Zugabe von 8 µL des sekundären Anti mouse Antikörpers (Anti-Mouse IgG (Whole Molecule) Alkaline Phosphatase Conjugate; Sigma)
BSA (1%):	1 g BSA ad 100 mL aqua dest.
Ponceau-S-Lsg:	Stammlösung 1:5 verdünnt
Färbelösung:	200 µL BCIP (25 mg/mL) Zugabe von 200 µL NBT (50 mg/mL in 70 % Dimethylformamid) Zugabe von 150 µL 1 M MgCl ₂ Zugabe von 600 µL 5 M NaCl Zugabe von 3 mL Sammelgelpuffer ad. 30 mL (frisch ansetzen)

2.10.4 Coomassie-Färbung

Zur Überprüfung, ob die Proteine quantitativ auf die Nitrocellulose transferiert wurden, erfolgte eine einfache Proteinfärbung mit Coomassie. Dazu wurde das bereits geblottete Gel 1 h in der Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt und so lange entfärbt, bis Proteinbanden sichtbar werden bzw. maximal 1 h.

Färbelösung:	0,25 % (w/v) Coomassie brilliant blue R250 50 % MeOH 50 % Essigsäure (10 %ig in dest. H ₂ O)
Entfärbelösung:	5 % MeOH 95 % Essigsäure (7,5 %ig in dest. H ₂ O)

2.10.5 Quantifizierung der Signalintensitäten

Die Auswertung der Western Blot Membranen erfolgte nach fotografischer Erfassung auf einem PC mit dem Programm *Scion Image*, mit dem über eine Integrierfunktion ein Vergleich der Intensitäten der jeweiligen Banden durchgeführt wurde.

2.11 Bestimmung der Gehalte an 4C-Nuclei mittels Flowcytometry

Diese Methode diente dazu die Zellzyklusaktivität in Kaffeebohnen während der Aufbereitung zu bestimmen. Nach Anfärbung mit Propidiumiodid kann über die Größe der Zellkerne direkt bestimmt werden wie viele Zellen sich in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus befinden. Das Prinzip beruht darauf, dass solche Kerne, die sich im Vorstadium der Teilung befinden wegen des verdoppelten Chromatidenmaterials auch in etwa doppelt so groß sind, wie Kerne mit einfachem Chromatidensatz wie sie in der G₁ oder beginnenden S-Phase vorliegen. Aus den Ergebnissen lässt sich daher auch ablesen, wie stark eine Zellneubildung im Gang ist. Die Bestimmung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Je fünf Embryos⁴ wurden auf Eis in 200 µL TBS (pH 7.3, mit Complete Mini Protease Inhibitor, Roche®, eine Tablette gelöst in 10 ml TBS) mittels einer Rasierklinge zerkleinert. Zu den zerkleinerten Embryos wurden 500 µL TBS (pH 7.3, mit Protease Inhibitor) und 5 µL RNase gegeben. Nach Inkubation (10 Min.) folgte ein Filtrieren durch einen 88 µm Nylonfilter und anschließende Zugabe von 5 µL Fluoreszenz-Farbstoff (Propidiumiodid, 1 mg/mL in H₂O). Nach einer Inkubation (20 Min. bei RT) wurde dieses Gemisch zur flowcytometrischen Analyse eingesetzt.

Geräteparameter:

Flowcytometer: DakoCytomation CYAN

Software: Summit v 4.0

Berechnungs-Software: ModFit LT v 3.1 von Verity Software House

Die Arbeiten mit dem Flowcytometer wurden am Plant Research International Institute in Wageningen, Niederlande durchgeführt.

⁴ zur Präparation der Embryos siehe Kapitel 2.9

2.12 Bestimmung der Expression der Isocitratlyase

Die Bestimmung der Expression der Isocitratlyase (ICL) erfolgte mittels RT-PCR auf der Basis von Gesamt-RNA, die aus Rohkaffeebohnen extrahiert wurde. Um eine verlässliche Quantifizierung zu gewährleisten, wurden die Analysen als kompetitive RT-PCRs mit einem internen RNA-Standard durchgeführt, der auf der Grundlage der bekannten ICL-Sequenz entwickelt wurde.

2.12.1 Probenmaterial für die Bestimmung der Isocitratlyase

Das Probenmaterial für die Untersuchungen zur Expression der ICL stammte sowohl aus Gewächshäusern als auch aus den Laboraufbereitungen. Für die Nullprobe wurden im Tropengewächshaus in Witzenhausen aus frischen roten Kaffeeirschen die Bohnen frei präpariert und vor Ort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die verwendeten Aufbereitungsproben entstammen parallel durchgeführten Laboraufbereitungen. Für die nasse Aufbereitung wurden die entpulpten Kaffeebohnen für 24 h fermentiert und anschließend bei 30°C für 12 h pro Tag getrocknet. Für die trockene Aufbereitung wurden die Kaffeeirschen ebenfalls bei 30°C täglich für 12 h getrocknet. Für die Analyse wurden Mischproben eingesetzt, die aus zweimal zehn unter Stickstoff gemörserten Bohnen bestanden. Aus diesen Proben wurde parallel die RNA isoliert.

2.12.2 Herstellung des internen Standards

Als interner Standard diente ein verlängertes Stück des in Vorarbeiten [15] hergestellten Plasmids mit einkloniertem ICL-Fragment (433 bp) (Abb. 19).

```
AACTTATTTTGGGATTGGGACCTGCCTAGAACCAGAGAGGGTTTCTACAGATTTAAGGGATCTG
TGACGGCTGCTATTGTTGCTGGCTGGGCTTTTGCTTCATACGCTGATCTAATTTGGATGGAGAC
TGCTGGCCCTGATTTGGTTGAATGCACAAAATTTGCTGAAGGAGTGAGGTCCAGGTGCCCTGAG
ATCATGTTGGCTTACAATCTCTCACCTTCCTTCAACTGGGATGCATCAGGAATGACTGATGAGC
AGATGAGAGATTTTCATTCCCAGAATTGCCAAATTGGGCTATTGTTGGCAGTTCATTACCGTGGC
CGGTTTCCATGCTGATGCTCTTATTGTTGACACATTTGCGAAGGATTTTGCAAGAAGAGGAATG
CTTGATATGTGGAGAAAATTCAAAGAGAGGAAAGGAACCATGAGGTTGACACACTGGCACACC
```

Abb. 19: Verwendetes ICL-Fragment. Unterstrichen sind die Forward und Reverse Primer-Bindungsstellen⁵.

Dazu wurde ein Stück Plasmid DNA aus pBR322 ausgeschnitten und anschließend zwischen der Forward Primer Bindestelle und der Reverse Primer Bindestelle des ICL Fragmentes wie folgt ligiert (Abb. 20).

⁵ Bei der Darstellung der molekularbiologischen Ergebnisse wurden die international einheitlichen Buchstaben für die Beschreibung der DNA- und RNA-Basen verwendet.

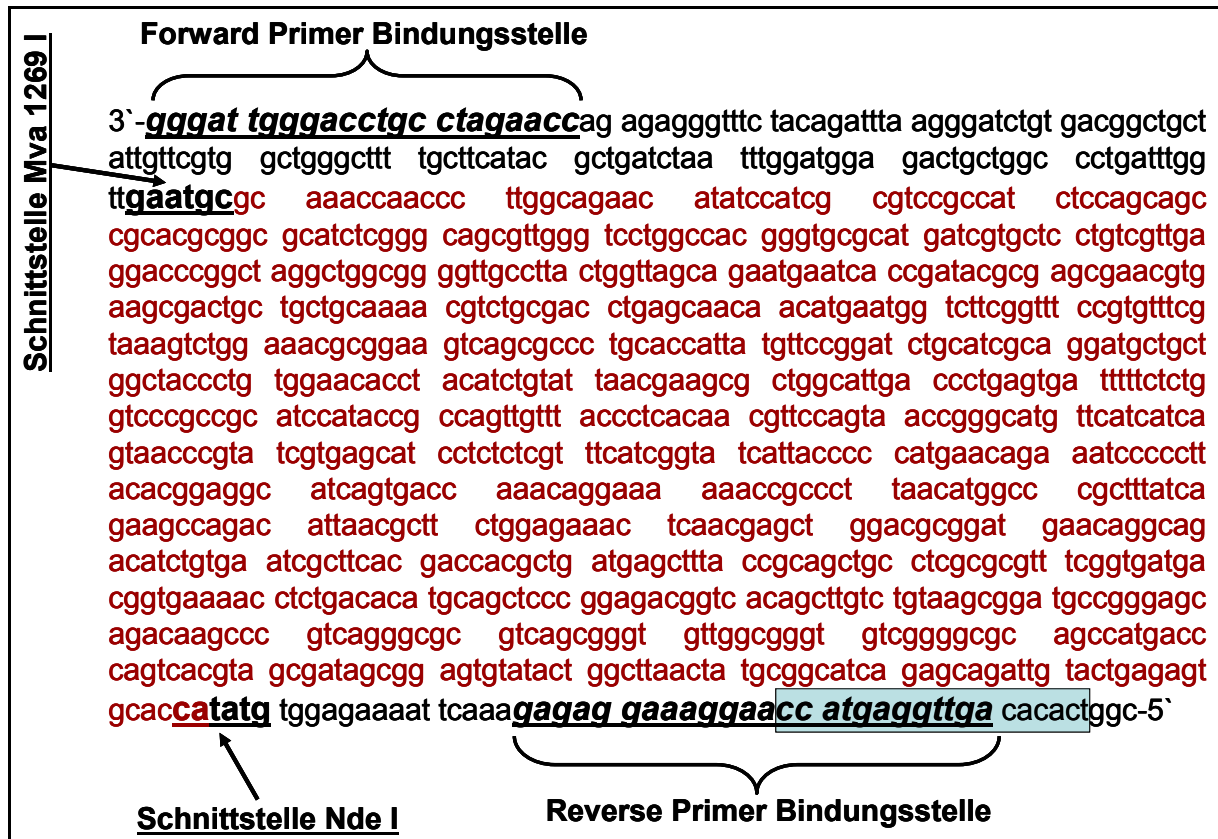


Abb. 20: Interner Standard für die PCR. Mit roten Buchstaben ist das Insert gekennzeichnet, das aus pBR322 stammt. Die als Reverse Primer Bindungsstelle gekennzeichnete Sequenz entspricht dem Primer, der für die RT-PCR-Analysen verwendet wurde. Da die RT-Reaktion mit einem spezifischen RT-Primer durchgeführt wurde (blau unterlegter Kasten) und die Taq-Polymerase einen Überhang von einigen Basenpaaren benötigt, musste der ursprüngliche Reverse Primer durch ein in der Sequenz etwas weiter vorne liegendes Stück ersetzt werden (geschwungene Klammer).

2.12.2.1. Herstellung der Inserts

Zunächst wurde die Plasmid DNA spezifisch an der Nde I Schnittstelle und später spezifisch an der Mva 1269 I Schnittstelle geschnitten. Dazu wurden 10 µg pBR322 als Stammkultur in DH5α-Zellen verwendet. Eine Übernachtskultur wurde angeimpft und nach 16 h nach der Plasmid-DNA Isolierungsmethode nach BIRNBOIM und DOLY isoliert [88]. Danach wurde wie folgt verfahren:

- Zugabe von 1/10 Volumenanteile 10 x Puffer R
- Zugabe von 1 µL Nde I (10 u/µL)
- Inkubation (3 h bei 37°C)
- Zugabe von 1 µL Mva 1269 I (10 u/µL)
- Inkubation (3 h bei 37°C)
- anschließend wird der Verdau mit Hilfe einer Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) wie folgt dephosphoreliert (2 Ansätze):

100 µL Verdau (pBR322 mit Nde I und Mva 1269 I geschnitten) wurden mit 26 µL 10 x CIAP Puffer versetzt. Nach Zugabe von 4 µL CIAP (1 u/µL) wurde 20 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Hitze-Inaktivierung (10 Min. bei 70°C).

Diese Proben wurden auf ein Agarose-Gel (1,2 %ig) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Ethidiumbromidfärbung, wurde die 942 bp große Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wird mittels eines Nucleo Spin Extract II Kits aus der Agarose gelöst und mit 30 µL Elutionspuffer eluiert. Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wurde die Probe bei OD_{260nm} vermessen.

2.12.2.2. Herstellung des Vektors

Zur Herstellung des Vektors wurde das bereits vorhandene ICL-Plasmid (pCR 2.1 mit einkloniertem ICL-Fragment) ebenfalls zunächst mit Nde I und dann mit Mva 1269 I geschnitten. Dafür wurden zu 6 µg Plasmid 1 µL Nde I und 1/10 Volumenanteile Puffer R gegeben und 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µL Mva 1269 I zugegeben und erneut 3 h bei 37°C inkubiert.

Nach dem Verdau wurden die Proben über ein Cycle Pure Kit aufgereinigt (pro Säulenaufreinigung zwei Ansätze). Die Elution erfolgte mit 35 µL H₂O bidest.

Der so erhaltene geschnittene Vektor wurde ebenfalls bei OD_{260nm} photometrisch vermessen.

2.12.2.3. Ligation von Insert und Vektor

Für die Ligation wurden 13 µL ($\hat{=}$ 200 ng) des geschnittenen ICL-Vektors eingesetzt. Dieser wurde über Nacht bei 16°C mit 11,8 µL ($\hat{=}$ 600 ng) Insert nach Zugabe von 3 µL ($\hat{=}$ 1/10 Volumen) 10 x Ligase Puffer, 1,9 µL H₂O bidest. und 0,3 µL T4 DNA Ligase (1Weiss u/µL) ligiert.

2.12.2.4. Transformation

Die Transformation wurde nach dem Transformationsprotokoll für chemisch kompetente Zellen (aus Instruction Manual für TA Cloning Kit, Invitrogen) durchgeführt.

Es wurden 50 µL DH5α-Zellen mit 3 µL des Produktes der Ligation transformiert.

Nach einer Inkubation (30 Min. auf Eis) erfolgte ein Hitzeschock (20 s bei 37°C) und eine erneute Inkubation (2 Min. auf Eis). Danach wurden 950 µL 37°C warmem LB Medium zugegeben. Nach Inkubation (1 h bei 240 rpm und 37°C im Wasserbad) wurde die Probe in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Medium-Platten, die 75 µg/ml Ampicillin enthielten, ausplattiert.

Die über Nacht bei 37°C gewachsenen Kolonien wurden mittels PCR auf positive Klone (also Klone, die das Plasmid mit dem Insert enthalten) wie folgt gescreent:

2.12.2.5. PCR-Colony-Screening

Tab. 6: PCR Ansatz:

Komponente	Volumen [μL]	Endkonzentration in PCR
PCR Puffer (Biotherm DNA polymerase Buffer)	1 μL	10 x
dNTPs	0,2 μL	10 mM
ICL 380 (Forward Primer)	0,2 μL	10 pmol/ μL
ICL 520 (Reverse Primer)	0,2 μL	10 pmol/ μL
Biotherm DNA Taq Polymerase	0,06 μL	5 u/ μL
H ₂ O bidest.	Ad 10 μL	
Template	je eine Bakterienkolonie	

Tab. 7: PCR Temperaturprogramm:

Zeit [s]	Temperatur in [$^{\circ}\text{C}$]	Vorgang
180	95	1. DNA-Denaturierung
30	95	2. DNA-Denaturierung
30	63	3. Annealing
60	72	4. Elongation
		5. 2.-4. 29 Zyklen
30	95	6. DNA-Denaturierung
240	72	7. Elongation

2.12.2.6. Vermehrung des positiven Klons

Nach Herstellung einer Reinkultur des positiven Klons 22 wurde zur Vermehrung eine Übernachtskultur dieses Klons (16 h bei 37°C und 240 rpm) angelegt. Ein Teil der Kultur wurde mit Glycerin (~15 %ig) als Stammkultur bei -70°C eingefroren. Aus dem anderen Teil der Kultur wurde die Plasmid DNA isoliert (Isolationsmethode siehe Kapitel 2.12.2.1).

2.12.2.7. Linearisierung der Plasmid-DNA

Zur Linearisierung wurde die Plasmid DNA des positiven Klons 22 mit dem Restriktionsenzym BamH I geschnitten. Dazu wurden zu 10 μg Klon 22 5 μL 10 x Puffer BamH I und 1 μL BamH I (10 u/ μL) gegeben und auf 50 μL mit H₂O bidest. Aufgefüllt. Nach der Inkubation (2 h, 37°C) wurde die lineare DNA mit dem Nucleo Spin Extract II Kit aufgereinigt.

2.12.2.8. In-vitro Transkription des internen Standards

Zur In-vitro Transkription dieser linearen DNA für den Internen Standard wurde der Ansatz (siehe Tabelle 8) zunächst inkubiert (2 h, 37°C). Danach wurde 1 u DNase I (100 u/ μL) zugegeben und erneut inkubiert (15 Min. bei 37°C).

Tab. 8: Ansatz für die In-vitro Transkription

Komponente	Volumen bzw. Menge
5 x Transkriptionspuffer	13 µL
NTPs (10 mM each)	10 µL
peqGold RNase Inhibitor (30 u/µL)	1,63 µL
T7 RNA Polymerase (20 u/µL)	1,4 µL
Interner Standard Klon 22	1 µg
H ₂ O bidest.	Ad 65 µL

Es schloss sich eine Phenol-Chloroformaufreinigung und eine Ethanol-fällung an. Dazu wurde zunächst Phenol:Chloroform (5:1; pH 4,3) im Volumenverhältnis 1:1 zugegeben, nach Schütteln (Vortexer) und Zentrifugation (2 Min., 13.000 rpm) wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Schritte wurden einmal wiederholt. Zur wässrigen Phase wurden zur Fällung der RNA 2,5 Volumenanteile eiskaltes EtOH (100 %ig) und 1/10 Volumenanteile 3 M Natriumacetat gegeben. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -70°C. Nach Präzipitation (30 Min, 13.000 rpm bei 4°C) wurde der Überstand abgezogen und mit 150 µL 70 %igem Ethanol (mit DEPC-H₂O angesetzt) gewaschen. Dafür wurde zentrifugiert (2 Min., 13.000 rpm) und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde unter der Cleanbench getrocknet und anschließend in 40 µL DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentration wurde fotometrisch bestimmt. Anschließend wurde 1 µL der Probe in die PCR-Reaktion eingesetzt (siehe Ansatz für PCR unter Kapitel 2.5.1.4 PCR-Colony-Screening) um die RNA-Probe auf DNA-Reste zu testen. Laut diesem Test wurde ein erneuter DNase I Verdau notwendig. Der Grad der Degradierung der RNA (Qualität der Probe) wurde über ein Agarose-Gel (1,2 %) ermittelt. Dazu wurden 400 ng Standard-RNA auf das Gel aufgetragen. War die Probe degradiert bzw. teilweise degradiert, schmierte die RNA-Bande nach unten.

Tab. 9: DNase I Verdau:

Komponente	Volumen [µL]
RNA Probe	30
10 x Puffer DNase I	3,5
1 M DTT	0,35
RNase Inhibitor (40 u/µL)	0,13
DNase I (100 u/µL)	0,35
Inkubation (20 Min. bei 37°C)	-
Reinigung mit Phenol-Chloroform und Ethanol-fällung	-
Resuspendieren der RNA in DEPC-H ₂ O	30 µL

Die gereinigte RNA wird erneut fotometrisch vermessen. Anschließend werden 100 ng RNA wiederum in eine Test-PCR gegeben, um mögliche DNA-Reste zu finden. Der RNA-Standard wird in einer RT-PCR ohne zu untersuchende RNA-Probe getestet. Die so eingestellten Standards werden in Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

Für eine Untersuchungsreihe wird ein Mastermix jeweils einer Konzentration verwendet.

2.12.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus Rohkaffee

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des peq Gold RNAPure Kits isoliert. Die Isolierung wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt. Dazu wurden ca. 200 mg gefrorenes Rohkaffeepulver mit 2 mL RNAPure homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 Min., 12.000 x g bei 4°C). Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 0,2 mL Chloroform zugegeben. Nach Schütteln (Vortexer) und 5 Min. Inkubation bei RT erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 Min., 12.000 x g bei 4°C). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte mit 0,25 mL Isopropanol und 0,25 mL Hochsalzlösung. Dazu wurde die Probe geschüttelt (Vortexer) und 10 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (30 Min. bei 12.000 x g und 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet in 0,2 mL peqGold Optipure (peqLab) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 Min. bei 3.000 g und 4°C) wurde der Überstand abgenommen und 0,2 mL Chloroform und 0,2 mL SDS-Lösung (0,5 %ig) zugegeben. Nach Schütteln (Vortexer) und erneuter Zentrifugation (5 Min. bei 3.000 x g und 4°C) wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Die erneute Fällung der RNA erfolgte mit 0,6 Volumenanteilen Isopropanol und 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat. Nach Inkubation (10 Min. bei RT) und Zentrifugation (30 Min. bei 12.000 x g und 4°C) wurde das Pellet mit 150 µL 70 %igem Ethanol gewaschen. Nachdem der Überstand komplett entfernt wurde; wurde das Pellet unter der Cleanbench luftgetrocknet (~3 Min.). Die RNA wurde anschließend wieder in 30 µL H₂O (DEPC behandelt) resuspendiert. Zur Entfernung der DNA wurde dann ein DNase I Verdau durchgeführt (siehe Kapitel 2.12.2.8). Die anschließende Aufreinigung und Fällung verlief ebenfalls analog (siehe Kapitel 2.12.2.8).

Anschließend wurde die Konzentration fotometrisch vermessen, um im Folgenden bestimmen zu können, welches Volumen 400 ng RNA entspricht. Das entsprechende Volumen der RNA Probe wurde auf einem 1,2 % Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt um den Grad der Degradation zu überprüfen. Anhand des Gels konnte auch die Konzentration ein zweites Mal überprüft werden. Die Intensität der einzelnen Banden musste gleich sein.

Zur Prüfung auf DNA Reste wurden 100 ng der RNA Probe in eine PCR eingesetzt. Eventuelle DNA-Reste wurden mit einem DNase I Verdau entfernt. Bei DNA freier Probe wurde diese anschließend auf 100 ng RNA/µL verdünnt und in Aliquots bei -70°C eingefroren.

2.12.4 RT-Reaktion

Die RT Reaktionen wurden mit Hilfe des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kits durchgeführt. Als RT-Primer wurde ein spezifischer ICL Primer verwendet (3'-ccatgaggttgacacact-5'; 10 µM). Der RT-Primer und der interne Standard wurden in den jeweiligen Konzentrationen als Mastermix angesetzt. Der Mastermix wurde verwendet, damit in jeder RT-Reaktion möglichst exakt gleiche Konzentrationen an internen Standard und spezifischen RT-Primer herrschen. 100 ng RNA Probe wurden mit 10 µM RT-Primer und 1, 10, 25 oder 50 pg Internen Standard versetzt. Diese Probenansätze wurden für 5 Min. bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde ein Mastermix aus dNTPs (10 mM), Reaktionspuffer (5-fach konz.), RNase Inhibitor (20 u/µL) und M-MuLV H-Minus Reverse Transcriptase (200 u/µL) hinzugefügt. Dieser RT-Ansatz wurde inkubiert (60 Min. bei 42°C). Durch eine Erhitzung (10 Min. bei 70°C) wurde die RT-Reaktion schließlich abgeschlossen. 1 µL dieser RT-Reaktion wurden anschließend als Template in der PCR eingesetzt:

Tab. 10: Ansatz für die RT-PCR mit internem Stand

Komponente	Volumen	Endkonzentration in PCR
PCR Puffer (Biotherm DNA polymerase buffer; Genecraft)	1 µL	10 x
dNTPs(Genecraft)	0,2 µL	10 mM
ICL 380 (Forward Primer) (3'-gggattgggacctgcctagaacc-5')	0,2 µL	10 pmol/µL
ICL 511 (Reverse Primer, 3'-gagaggaaaggaacctgaggttga-5')	0,2 µL	10 pmol/µL
DMSO (99,5% Sigma)	0,2 µL	
DNA Taq Polymerase (Biotherm DNA Taq polymerase Genecraft)	0,06 µL	5 u/µL
Template (RT-Produkt)	1 µL	
H ₂ O Bidest.	ad 10µL	

Für jede RT-Probe wurden zwei PCR-Amplifikationen (PCR-Temperaturprogramm siehe Tab. 7) durchgeführt.

2.12.5 Analyse mittels Elektrophorese

Die amplifizierten RT-PCR-Proben wurden über ein Agarose Gel (SeaKem LE agarose 1,2 %, Biozym mit 1x TAE Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt.

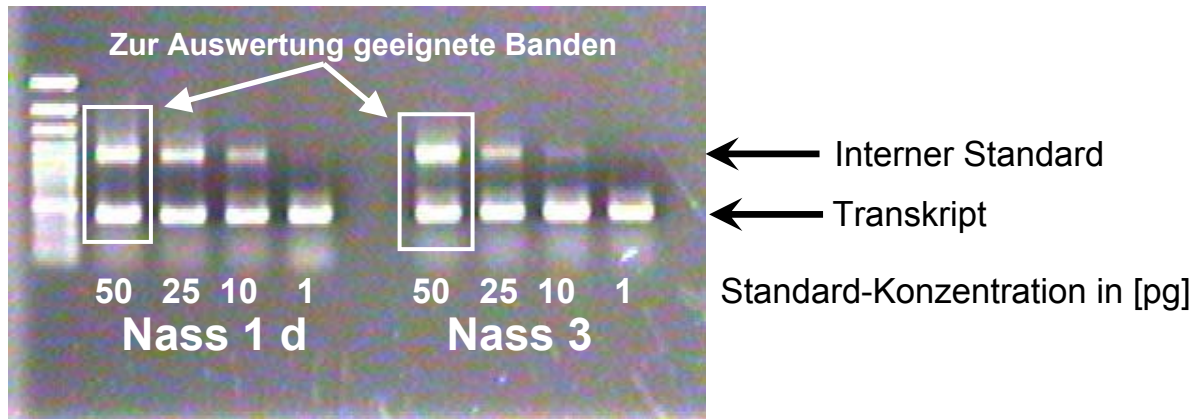


Abb. 21: Beispiel eines Gels einer RT-PCR von ICL-Transkripten in nass aufbereiteten Rohkaffeebohnen.

Die Auswertung der Gele erfolgte über die Bandenintensitäten mit dem Programm *Scion Image*. Die Spur, in der die Bandenintensität von Transkript und Internem Standard optisch nahezu gleich ist, wird jeweils zur Auswertung herangezogen.

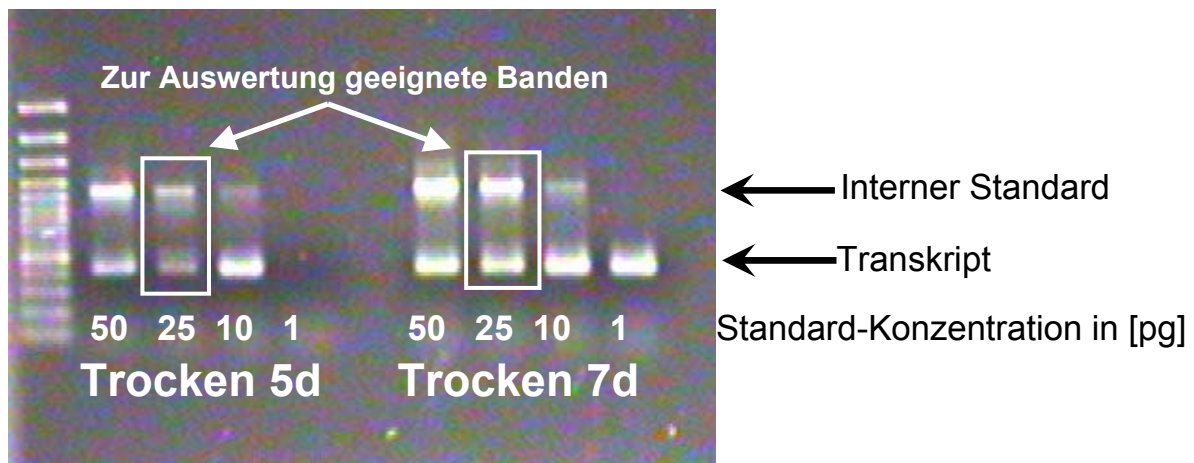


Abb. 22: Beispiel eines Gels einer RT-PCR von ICL-Transkripten in trocken aufbereiteten Rohkaffeebohnen.

Die in Kapitel 3.1.2.2 dargestellten Ergebnisse sind die Mittelwerte der Expressionen von Doppelbestimmungen mit jeweils zwei RT-Reaktionen und je einer PCR-Wiederholung (8 Werte).

2.12.6 Geräte für die Bestimmung der ICL-Expression

Photometer:	Gene Quant II Pharmacia Biotech
Thermocycler:	Biometra Personal Cyclers
Elektrophorese-Apparatur:	Biometra Agagel Standard
Powersupply	Bio-Rad Laboratories Model 500/200

2.13 Wassergehaltsbestimmungen

Die Wassergehalte von Rohkaffeebohnen und Kaffeeblättern wurden durch Differenzwägungen von Frisch- und Trockengewicht ermittelt. Dabei wurde das Frischgewicht durch Wägung des frischen Materials (bei Bohnen aus der Fermentation wurde ggf. an der Oberfläche haftendes Wasser mit Zellstoffpapier abgetupft) bestimmt. Für die Bestimmung der Trockenmasse wurden die Blätter in einem Labortrockenschrank 12 h bei 105°C getrocknet und anschließend auf einer Analysenwaage gewogen. Bei den Analysen zu den niedermolekularen Kohlenhydraten und den freien Aminosäuren wurde das tiefgefrorene Samenpulver vor den jeweiligen Analysen gefriergetrocknet.

3. Ergebnisse und Diskussion

In diesem Abschnitt werden zunächst jeweils die erzielten Ergebnisse präsentiert und anschließend im Kontext diskutiert. Das Kapitel gliedert sich in drei Teile.

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Erfassung und Beschreibung des allgemeinen physiologischen Status der Kaffeesamen während der Aufbereitung, der zweite mit ihrem Status während der Lagerung. Um den physiologischen Status treffend beschreiben zu können, wurden diverse Parameter berücksichtigt. Im Zentrum standen dabei:

- Reifestadium
- Keimungsprozesse
- Stressreaktionen
- Vitalität
- Enzymatische Speicherstoffmobilisation oder Desintegrationsreaktionen nach Zelltod.

Im dritten Teil werden die Ergebnisse zu Konzentrationsänderungen der niedermolekularen Zucker und der freien Aminosäuren, die für das Aromapotential des Rohkaffees sehr bedeutsam sind, zunächst während der Aufbereitung und anschließend während der Lagerung präsentiert und diskutiert.

3.1 Bestimmung des physiologischen Status der Kaffeesamen während der Aufbereitung

Um festzustellen, wie sich Aufbereitung und Lagerung auf die Physiologie der Kaffeesamen auswirken, wurde der physiologische Status vor, während und nach Abschluss der Aufbereitung bestimmt.

3.1.1 Reifestadium der Kaffeekirschen

Das Reifestadium bei Kaffeefrüchten definiert sich wie bei vielen anderen Früchten über die Farbe der Fruchtschale [89].



Abb. 23: Unsortierte Kirschen nach maschineller Ernte.

Durch die in Brasilien übliche Ernte nach der so genannten *Stripping*-Methode oder maschineller Ernte kommt es zu einer heterogenen Zusammensetzung des Ernteguts (siehe Abb. 23). Eine solche Ernte liefert unreife Früchte (grün oder gelb), reife Früchte (rot) und überreife Früchte (schwarz) in wechselnden Anteilen. Bei der



Abb. 24: Unsortierte (links) sowie aussortierte überreife schwarze und für die trockene Aufbereitung verwendete vollreife rote Kirschen.

nassen Aufbereitung werden jedoch nur vollreife Kirschen weiterverarbeitet (siehe Abb. 1). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten und einen unerwünschten Reifeeffekt auszuschließen, müssen also auch die Proben der trockenen Aufbereitung aus ausschließlich reifen Früchten hervorgehen. Um dieses sicherzustellen, wurden die Proben manuell sortiert (siehe Abb. 24). Für beide Aufbereitungen wurden also nur vollreife rote Kaffee Früchte verwendet.

3.1.2 Keimungsprozesse in Rohkaffeebohnen

Kaffeesamen weisen sowohl typische Merkmale rekalcitranter Samen, wie eine ausgeprägte Kälteempfindlichkeit, als auch typisch orthodoxe Merkmale, wie das Überstehen einer künstlichen Trocknung, auf. Daher wurden sie in eine intermediäre Gruppe zwischen rekalcitranten und orthodoxen Samen [73] eingeordnet. Die Kaffeesamen benötigen keine Dormanzperiode und sind mit einem hohen Feuchtegehalt von etwa 50 % sofort keimfähig [77]. Ein vorzeitiges Keimen wird offenbar durch im Fruchtfleisch lokalisierte hemmende Prinzipien verhindert [13, 14]. Bei der nassen Kaffeeaufbereitung wird das Fruchtfleisch entfernt. Darüber hinaus erfolgt eine Fermentation unter Wasser (in Brasilien 16 – 24 h). Es ist zu vermuten, dass dies zur sofortigen Einleitung der Keimung führt. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass nach BEWLEY und BLACK (1994) bei orthodoxen Samen die Keimung mit der Wasseraufnahme und Quellung beginnt und dann endet, wenn die Keimwurzel die Samenschale bzw. die Endospermkappe durchbricht [90]. Da bei frischen Kaffeesamen, aufgrund des hohen Wassergehaltes, keine Quellung erfolgt, muss hierbei der Beginn der Keimung auf biochemischer und physiologischer Ebene bestimmt werden. Da derartige Prozesse makroskopisch nicht detektierbar sind, wurde die Möglichkeit einer Keimung von anderen Arbeitsgruppen bisher nie in Betracht gezogen.

Um diese zentrale Frage zu beantworten, wurden die Proben auf keimungsspezifische Enzyme sowie die Wiederaufnahme eines aktiven Zellzyklus untersucht.

3.1.2.1 Die Bestimmung der Zellzyklusaktivität

Ein wichtiger Marker für den physiologischen Status von Zellen ist der Zellzyklus. Der Zellzyklus besteht in der Regel aus vier ineinander übergehenden Phasen (G₀, G₁, S, G₂ und der eigentlichen Mitose (Kernteilung) – wobei G engl. für *gap* = Lücke steht und S engl. für *synthesis* = Synthese). Mit der Bestimmung des Zellzyklus im Embryo der Kaffeesamen kann man Aussagen darüber treffen, ob und wie stark während der einzelnen Aufbereitungsphasen eine mit Keimungsaktivität assoziierte Zellteilung stattfindet.

Für die Bestimmung der Zellzyklusaktivität eignet sich zum einen die Bestimmung des Verhältnisses von 2C zu 4C-Kernen⁶ (Kerne mit doppeltem bzw. vierfachem Chromosomensatz) per Flowcytometry, zum anderen der immunologische Nachweis von β -Tubulin, das Bestandteil des während der Mitose agierenden Spindelapparates ist.

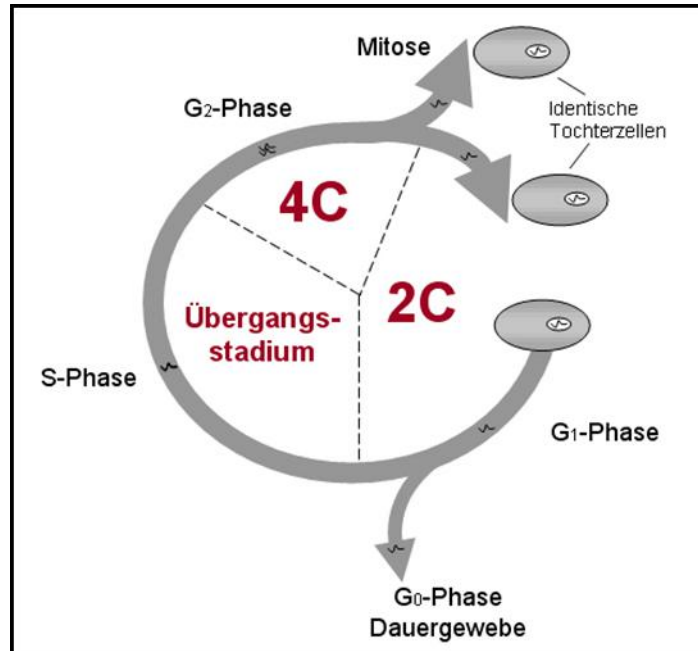


Abb. 25: Darstellung des Zellzyklus (mit den sogenannten 4C- und 2C-Phasen).

3.1.2.1.1 Bestimmung des Anteils an 4C-Nuclei in Kaffeeembryos

Ein häufig angewandtes Verfahren zur Bestimmung der Zellzyklusaktivität in Samen ist die Flowcytometry [91-93]. Bei dieser Methode kann nach *Anfärbung* mit Propidiumiodid oder anderen DNA-spezifischen Farbstoffen die Größe der Zellkerne bestimmt werden. Abhängig von der Spezies und vom Gewebe befinden sich bei arretiertem Zellzyklus bestimmte Anteile der Nuclei in der G₀ oder G₁-Phase und die Übrigen in G₂-Phase [94, 95]. Ein Anstieg im Anteil an 4C-Kernen im Embryo kennzeichnet die Wiederaufnahme des Zellzyklus und ist ein deutliches Merkmal für eine einsetzende Keimung [96].

Es wurden die flowcytometrischen Daten von unbehandelten sowie von parallel nass und trocken aufbereiteten Kaffeesamen aufgenommen. Hierfür wurden die Embryos von frischen Kaffee Früchten präpariert. Des Weiteren wurden Laboraufbereitungen durchgeführt und Samen zu verschiedenen Stadien der nassen

⁶ Im tetraploiden Kaffeesamen ist eigentlich die Bezeichnung 8C für einen verdoppelten Chromosomensatz zutreffender. Da sich bei den Samenphysiologen bei der Benennung eines verdoppelten Chromosomensatzes per Flowcytometry – ungeachtet des sonstigen Ploidiegrades – jedoch die Bezeichnung 4C eingebürgert hat, wird auch in dieser Arbeit der einfache Chromosomensatz mit 2C und ein verdoppelter Chromosomensatz mit 4C beschrieben.

und der trockenen Aufbereitungen entnommen und sofort für die Bestimmung eingesetzt.

Erste Versuche dieser Art lieferten ungenaue Ergebnisse, weil entweder luftgetrocknete oder in Stickstoff schockgefrorene Embryos für die flowcytometrischen Untersuchungen verwendet wurden. Erst der Einsatz von frischem, vor Ort präparierten, Materials lieferte zuverlässige Ergebnisse.

Gehalt an 4C-Nuclei in Kaffee-Embryos

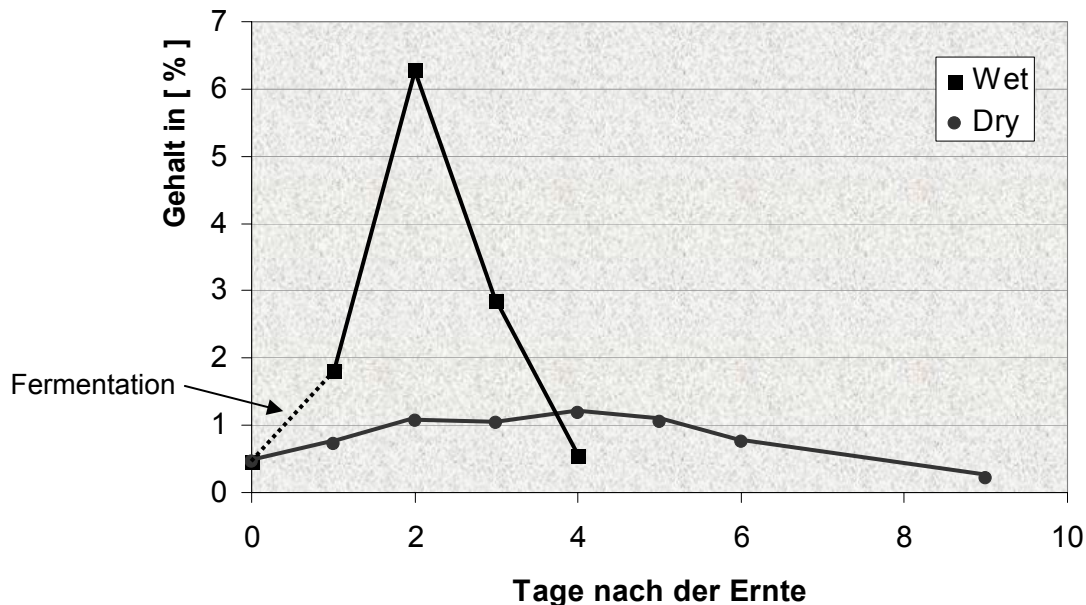


Abb. 26: Veränderungen des prozentualen Gehaltes an verdoppelten Zellkernen, d.h. solchen Kernen, die bereits den doppelten Chromosomensatz besitzen, sich aber noch nicht geteilt haben (4C-Nuclei). Jeder Messwert repräsentiert eine Mischprobe aus 10 frischen Embryos.

In Samen, die der nassen Aufbereitung unterworfen wurden, ist ein deutlicher Anstieg im Anteil an 4C-Kernen zu verzeichnen. Das Maximum wurde für den zweiten Tag der Nacherntebehandlung festgestellt. Die Ergebnisse bestätigen zum einen den von BYTOF (2003) [15] gefunden leichten Anstieg der 4C-Nuclei während der Fermentation, zeigen aber zum anderen einen noch viel stärkeren Anstieg der 4C-Nuclei während der sich anschließenden Trocknung der nass aufbereiteten Bohnen. Die Werte zeigen auch, dass die Gehalte an 4C-Nuclei bei nass aufbereiteten Bohnen während des Trocknungsprozesses rasch wieder abnehmen. Die Ursache für den Rückgang der Zellzyklusaktivität ist vermutlich in der fortschreitenden Trocknung zu sehen, die einem Fortgang von Keimungsaktivität entgegen wirkt.

Die trocken aufbereiteten Bohnen erreichten am vierten Tag der Aufbereitung ein Maximum im Anteil an 4C-Kernen. Dieses ist wesentlich schwächer ausgeprägt, als es bei der nassen Aufbereitung festzustellen war. Es ist festzustellen, dass aus

dem unterschiedlichen Verlauf dieser Kurven ein Unterschied im physiologischen Status der Kaffeesamen offensichtlich wird.

In einer jüngeren Arbeit wurde der Anstieg von 4C-Nuclei in Kaffeeembryos während der Keimung untersucht [81]. Dabei wurde ein Anstieg an 4C-Kernen erst in einem wesentlich späteren Zeitraum festgestellt. Allerdings wurden in dieser Arbeit keine frischen Kaffeesamen verwendet, sondern getrocknetes Saatmaterial, das durch eine nasse Aufbereitung und anschließende Trocknung gewonnen wurde. Somit wurde nicht die Keimung in *sensu strictu* beschrieben, sondern ausschließlich die Wiederaufnahme von Prozessen, die durch zwischenzeitliche Austrocknung unterbrochen wurden.

3.1.2.1.2 Bestimmung des β -Tubulin-Gehaltes

Bei dieser Bestimmung wird die Tatsache genutzt, dass eine Aufnahme von Zellteilungsaktivität mit einer *de novo* Synthese von β -Tubulin assoziiert ist [81, 97-99]. β -Tubulin ist ein Bestandteil des Spindelapparates, der die Chromatiden nach deren Duplikation am Äquator zu den beiden Polen zieht und so die Kernteilung (Mitose) perfekt macht. Die Spindelfaserproteine α - und β -Tubulin unterliegen einem hohen *Turnover* und sind in Zellen, deren Zyklus arretiert ist, nicht oder nicht mehr detektierbar. DE CASTRO *et al.* (2005) wies bei Arabica-Kaffee in anfänglichen Stadien der Samenreifung hohe Gehalte an β -Tubulin nach, die dann jedoch allmählich zurückgingen bis sie in den Endstadien der Reifung fast nicht mehr detektierbar waren [100]. Demzufolge sollten frische, der Aufbereitung unterworfenen Kaffeesamen nahezu frei von β -Tubulin sein. Daher kann man anhand eines erneuten Anstiegs des β -Tubulin-Gehaltes feststellen, in welchem Umfang - ausgelöst durch die Aufbereitung - Zellneubildungen und damit Keimungsvorgänge im Embryo ablaufen.

Die β -Tubulin-Bestimmung erfolgte mit Hilfe von *Western-Blots*. Hierzu wurde die zu untersuchende Proteinfraction zunächst mittels Gelelektrophorese nach Größe getrennt. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nylon-Membran erfolgte der Nachweis des β -Tubulins über immunologische Techniken. Dabei resultiert eine Anfärbung der Membran an den Stellen, an denen β -Tubulin vorliegt (siehe Abb. 27).

Der β -Tubulin-Gehalt von Kaffeesamen wurde in Embryonen bestimmt, die aus schockgefrorenen frischen sowie unterschiedlich aufbereiteten Kaffeesamen extrahiert worden waren. Die Proben entstammten ausschließlich Laboraufbereitungen. Abb. 27 zeigt, dass bei Samen aus frischen Kaffeekirschen nur ein sehr schwaches Signal zu erkennen ist. Die Auswertung der Signalintensitäten (mit dem Programm *Scion Image*) erbrachte die in Abb. 28 und Abb. 29 gezeigten Ergebnisse.

Die folgenden Arbeiten sind von Herrn Björn Breitenstein im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt worden [101]:

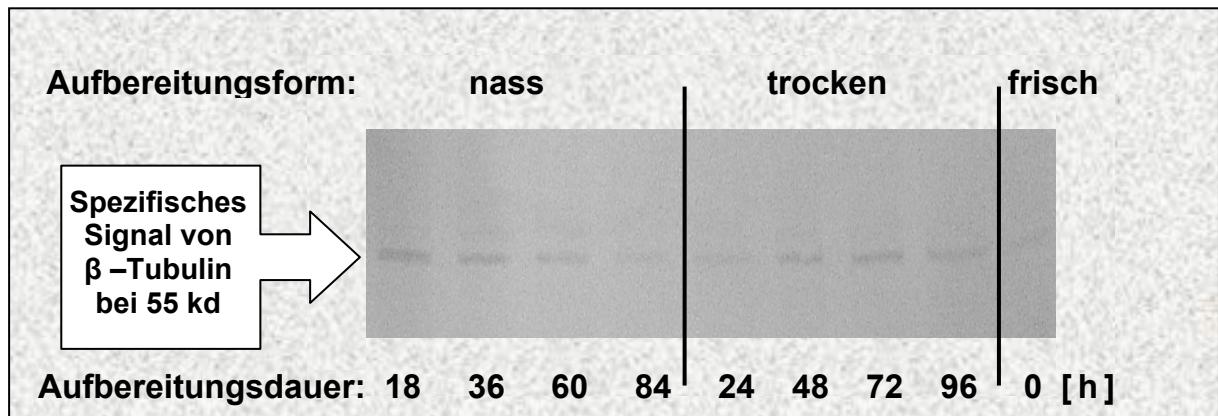


Abb. 27: *Western Blot* Analysen von Embryos, welche aus nass und trocken aufbereiteten Kaffeebohnen während der Aufbereitung herauspräpariert wurden, im Vergleich mit Embryos aus Bohnen frischer Kaffee-Kirschen (Fermentation bei der nassen Aufbereitung hier 18 h).

Im Zuge der nassen Aufbereitung taucht relativ schnell nach einem Tag Fermentation ein deutliches β -Tubulin-Signal auf. Dieses ist nach zwei Tagen noch stärker und wird dann mit zunehmender Austrocknung der Bohne schwächer, sodass nach dreieinhalb Tagen offenbar kaum noch β -Tubulin in den Embryos vorhanden ist. Bei der trockenen Aufbereitung hingegen, gibt es anfänglich nur sehr schwache Anzeichen für eine β -Tubulin-Synthese, doch nach zwei Tagen Aufbereitung zeigen sich auch bei diesen Bohnen sehr deutliche β -Tubulin-Signale. Nach vier bis sechs Tagen trockener Aufbereitung waren maximale β -Tubulin-Signale festzustellen, die dann, wohl vor allem bedingt durch die zunehmende Austrocknung, wieder schwächer wurden.

Diese Analysen belegen auf der Basis des β -Tubulins, dass es in Meristemen der Kaffeeembryos bei beiden Aufbereitungsformen zu einer Neubildung des Spindelapparates kommt und zeigen somit eine Zellneubildung an. Damit bestätigen diese Untersuchungen die Ergebnisse der Flowcytometry.

Die Verläufe der β -Tubulin-Synthese sind zeitlich und vom Umfang her unterschiedlich. Nass aufbereitete Bohnen reagieren sehr schnell (innerhalb von 18 h) vermutlich auf die Entfernung des Fruchtfleisches vor der Fermentation mit β -Tubulin-Synthese (siehe Abb. 28).

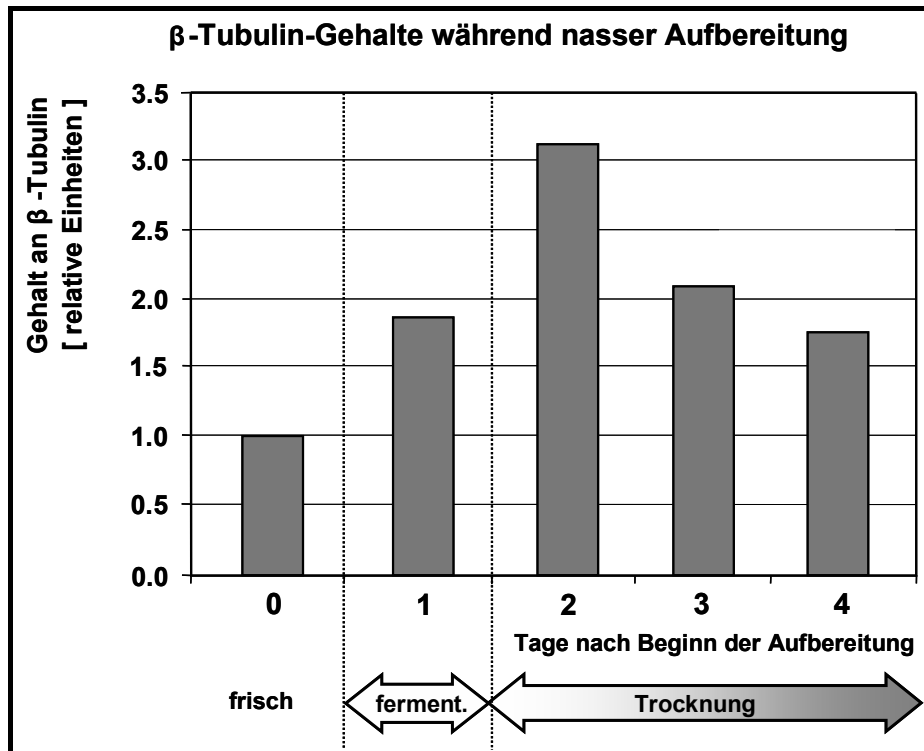


Abb. 28: Relative Gehalte an β -Tubulin in Kaffeesamen (*Coffea arabica* L.) während nasser Aufbereitung.

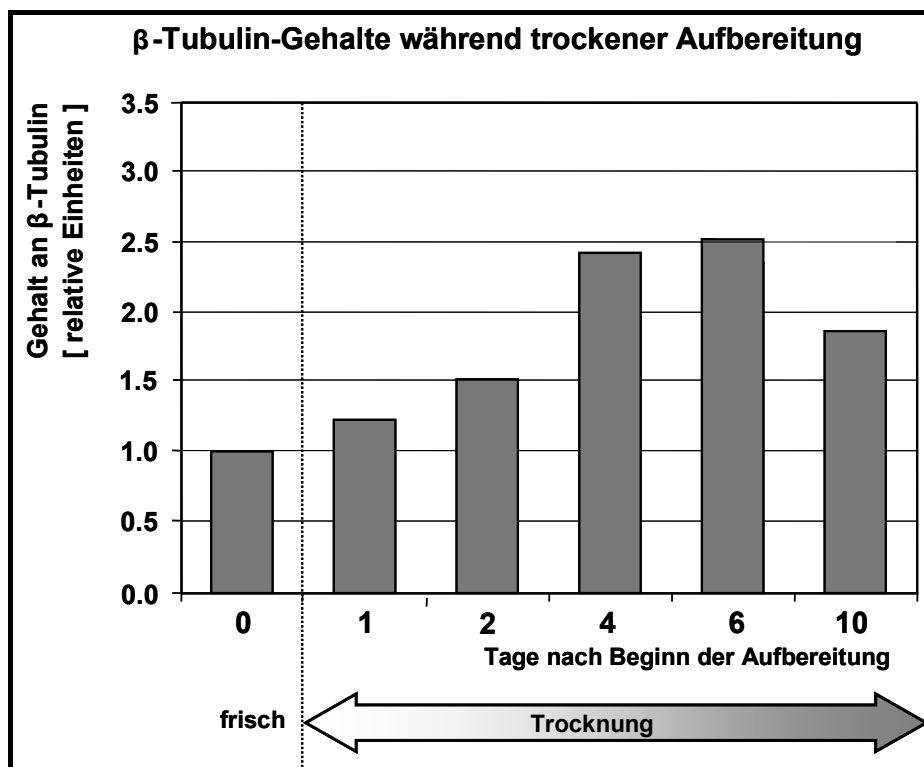


Abb. 29: Relative Gehalte an β -Tubulin in Kaffeesamen (*Coffea arabica* L.) während trockener Aufbereitung.

Trocken aufbereitete Bohnen legen im Laufe ihrer - im Vergleich zur nassen Aufbereitung langsamen - Trocknung um zwei bis drei Tage zeitlich versetzt ebenfalls eine deutliche, wenn auch nicht ganz so ausgeprägte β -Tubulin-Akkumulation an den Tag (siehe Abb. 29). So zeigen auch diese Analysen einen

Keimungsstoffwechsel auf, der bei beiden grundsätzlich unterschiedlichen Aufbereitungsformen des Rohkaffees verschieden stark ausgeprägt ist. Dieser ungleiche Verlauf, der die beobachteten Unterschiede im Verlauf der 4C-Nuclei bestätigt (siehe Kapitel. 3.1.2.1.1), belegt zweifelsfrei Unterschiede in der Ausprägung des Zellzyklus der unterschiedlich aufbereiteten Kaffeesamen.

3.1.2.2 Die Expression von keimungsspezifischen Enzymen

Eine weitere Methode, den Keimungsstatus von Samen zu bestimmen, ist die Analyse der Expression von keimungsspezifischen Enzymen [102]. Bei fetthaltigen Samen - und Kaffee fällt mit einem Lipidgehalt von 7 – 17 % [11] in diese Kategorie - gehören Enzyme des Glyoxylat-Zyklus zu den ersten, die expremiert werden. Über diesen Stoffwechselweg wird Energie aus den Fettreserven gewonnen. Das Schlüsselenzym hierbei ist die Isocitratlyase (EC 4.1.3.1).

Die Bestimmung geringer Anfangsaktivität der Isocitratlyase ist relativ schwierig und würde besonders in den phenolreichen Kaffeesamen problematisch. Da in der Regel einem Anstieg an Enzymaktivität ein Anstieg an translatierbaren mRNAs von ICL vorausgeht, soll in dieser Arbeit die Bestimmung des Keimungsstatus über die Analyse der ICL anhand der Expression dieses Enzyms erfolgen. In Vorarbeiten an unserem Institut wurde bereits eine homologe Sonde hergestellt, die einen Nachweis über das Vorhandensein von ICL-mRNAs in Rohkaffee-Extrakten möglich machte [103]. Zunächst wurde versucht, die Expression dieses Enzyms über *Northern Blots* zu bestimmen. Leider erwies sich diese Methode als zu unsensitiv [15]. Deshalb wurde die empfindlichere Methode der RT-PCR angewandt.

RT-PCR-Produkte können nicht direkt über die Intensität der detektierten Signale miteinander verglichen werden, da bereits kleinste Unterschiede in den experimentellen Bedingungen auch bei Verwendung der gleichen Probe zu verschieden starken PCR-Signalen führen. Ebenso könnte die exponentielle Vermehrung der Transkripte auch bei Proben sehr verschiedener Konzentration zu Signalen von nahezu gleicher Intensität führen. Um diesen Faktor zu berücksichtigen und damit die Expression der ICL über die Signale der RT-PCR quantifizieren zu können, muss ein interner Standard eingesetzt werden. Die Zugabe eines internen Standards ist auch bei anderen chemischen Analysen üblich; z.B. die Zugabe eines Stoffes, der ähnlich dem zu bestimmenden ist, aber nicht in der Probe vorkommt (siehe z.B. Norvalin bei den Analysen der Aminosäuren und Melezitose bei der Zuckeranalytik in den Kapiteln 2.7 bzw. 2.8). Doch bei der RT-PCR sind an den Standard andere Anforderungen gestellt. Er muss mit dem eigentlichen Transkript konkurrieren (kompetitive RT-PCR), um eine exakte Quantifizierung zu gewährleisten.

Deshalb wurde dieser Standard so konstruiert, dass er die gleichen Primer-Bindungsstellen wie das zu untersuchende Transkript, also das ICL-Fragment, hat. Gleichzeitig ist er um eine deutliche Anzahl Basenpaare größer als das ICL-

Genfragment, um später eine eindeutige Unterscheidung zwischen Probenbande und Standardbande in der Gelelektrophorese zu ermöglichen (für die Sequenz des internen Standards siehe Kapitel 2.12.2).

Unter Zuhilfenahme des internen Standards wurden RT-PCR-Analysen der Kaffeesamen aus den verschiedenen Aufbereitungen durchgeführt. Diese halbquantitativen Bestimmungen zeigen, wie viel ICL in den unterschiedlichen Phasen der verschiedenen Aufbereitungen bzw. in den unbehandelten frischen Samen jeweils expremiert wird. Damit können auch über diese Analysen Beginn und Fortschritt der Keimung abgeschätzt werden.

Die Analysen erbrachten, dass in frischen, unbehandelten Samen eine geringe Menge an ICL-Transkripten vorhanden ist (siehe Abb. 30). Dieses Vorhandensein geringer Mengen an ICL-Transkripten in frischen Kaffeekirschen kann bedeuten, dass bereits in der Frucht mit der Keimung assoziierte Prozesse induziert worden sind. Ähnliche Beobachtungen, in Bezug auf eine Keimungsinduktion noch in der Frucht, wurden von ELLIS *et al.* (1991) gemacht [74]. Im Verlauf der trockenen Aufbereitung (Abb. 30) steigt die Transkriptmenge im Vergleich zu den Bohnen frischer Kaffeekirschen während der Trocknung stetig an und erreicht ihr Maximum nach etwa sieben Tagen. Danach sinkt die Expression im Lauf der zweiten Woche der Trocknung wieder auf etwa das Niveau der frischen Bohnen ab.

Bei der nassen Aufbereitung hingegen steigt die Transkriptmenge deutlich schneller an. Das Maximum der Expression ist bereits zwei Tage nach dem Start der Aufbereitung erreicht (siehe Abb. 31). Danach sinken die Transkriptmengen in den nass aufbereiteten Bohnen wieder, um am Ende der Trocknung nach sechs Tagen Werte zu erreichen, die denen der Bohnen am Ende der trockenen Aufbereitung entsprechen. Vergleicht man bei diesen Untersuchungen die maximal erreichten Werte, so kann man keinen quantitativen Unterschied zwischen der Expression der ICL in nass und in trocken aufbereiteten Samen feststellen. Im Gegensatz dazu zeigt jedoch der Vergleich der beiden Aufbereitungen einen grundsätzlichen Unterschied im zeitlichen Verlauf der ICL-Expression. So steht dem steten siebentägigen Anstieg während der trockenen Aufbereitung ein sprunghafter Anstieg der ICL-Transkripte innerhalb von nur zwei Tagen bei der nassen Aufbereitung gegenüber. Die nass aufbereiteten Bohnen erreichen ein vergleichbares Minimum an ICL-Transkripten bereits wieder nach sechs Tagen, bei den trocken aufbereiteten ist dieser Verlauf auf zwei Wochen ausgedehnt.

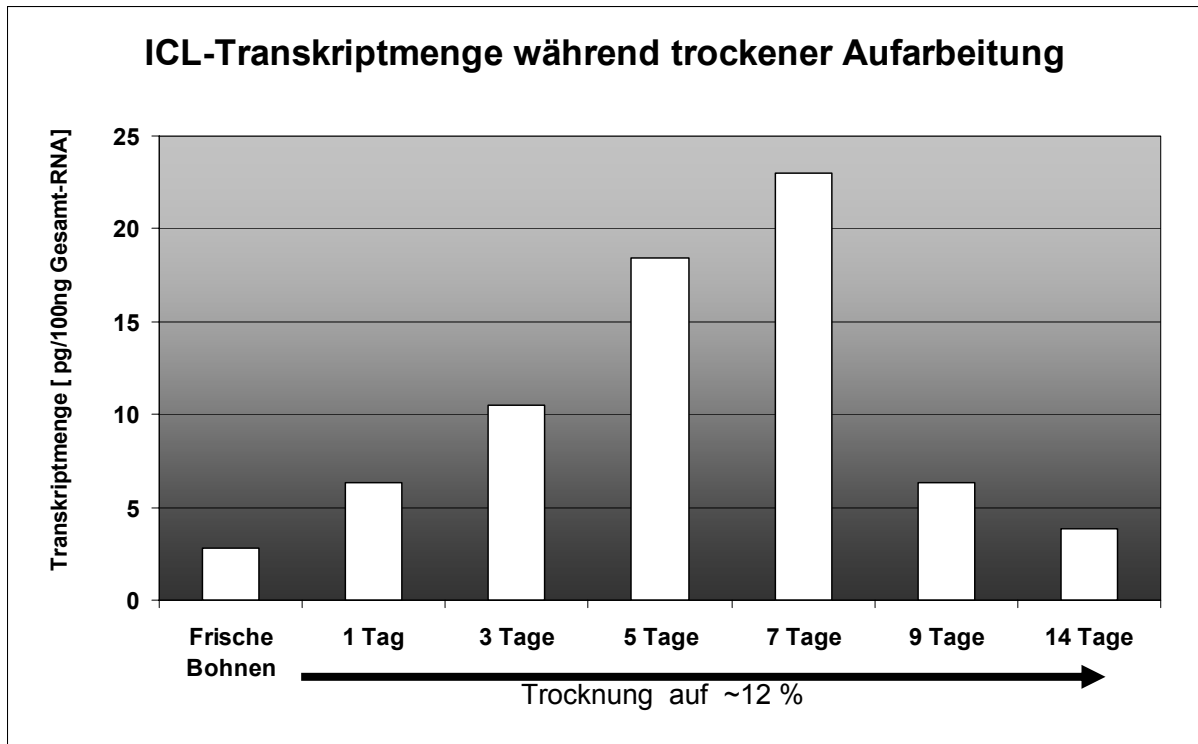


Abb. 30: Entwicklung der ICL-Transkriptmenge während trockener Aufbereitung. Bei dieser Analysenserie wurden Samen aus dem Botanischen Garten, Witzenhausen verwendet. Wiederum wurden sowohl frische wie auch parallel nass und trocken aufbereitete Samen für die Analysen eingesetzt.

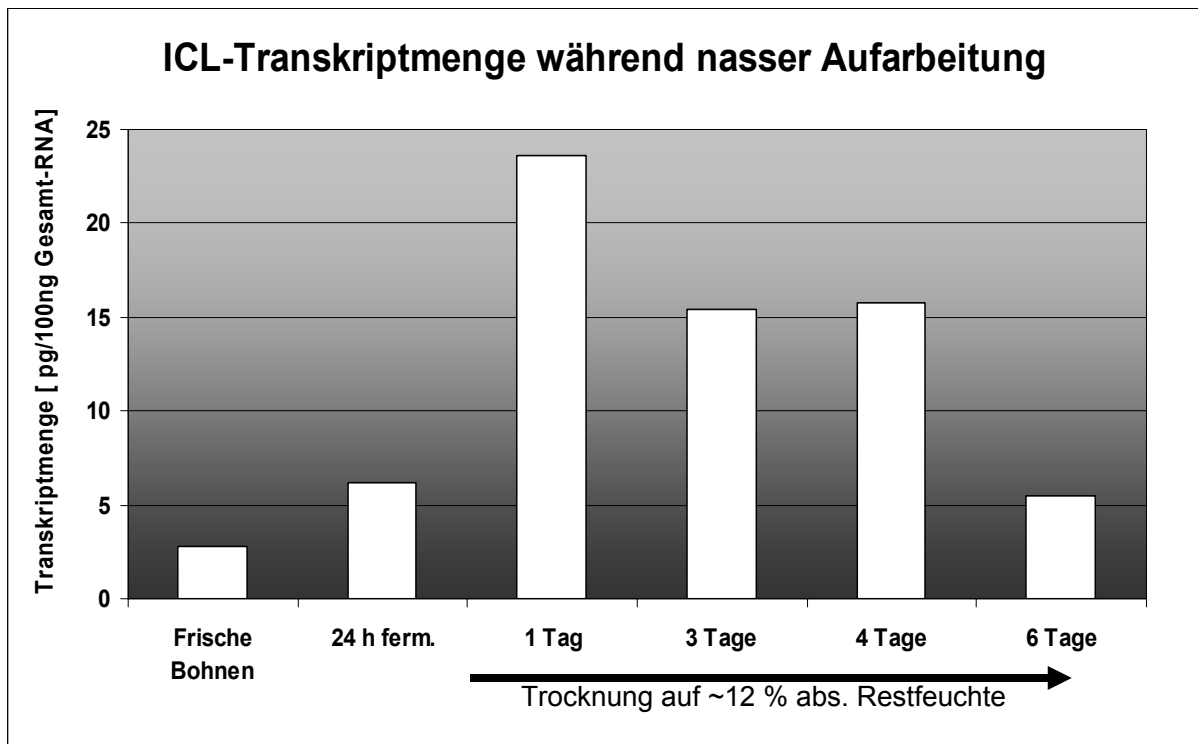


Abb. 31: Entwicklung der ICL-Transkriptmenge während nasser Aufbereitung. Die Bohnen sind in dieser Art der Aufbereitung bereits nach vier Tagen „knochentrocken“, d.h. sie erreichen das Level der für Kaffeesamen üblichen 10 bis 12 % Restfeuchte. Ein sich anschließender weiterer Abfall ist bei diesen instabilen RNA-Transkripten wahrscheinlich und wird durch das dokumentierte Absinken nach sechs Tagen untermauert.

Es konnte bestimmt werden, wie stark ausgeprägt die Expression von ICL jeweils zu bestimmten Zeitpunkten der verschiedenen Aufbereitungen ist. Mit dieser Methode lassen sich also ein deutlich anderer Expressions-Verlauf und somit unterschiedliche physiologische Zustände in den unterschiedlich aufbereiteten Samen nachweisen. Damit wurde anhand der halbquantitativen Bestimmung der Expression der keimungsspezifischen ICL belegt, dass die Kaffeesamen während der Aufbereitung tatsächlich keimen und dass der Verlauf der Keimungsprozesse bei beiden Aufbereitungsmethoden unterschiedlich ist.

Bei den Analysen der ICL-Expression wurde zudem bei der Bestimmung des Nullwertes (die frische unbehandelte Probe) verschiedener Proben festgestellt, dass bei solchen aus Übersee, die eine gewisse Flugdauer hinter sich hatten, zumeist signifikant erhöhte Werte vorhanden waren. Die geringsten Transkriptmengen wurden stets in solchen Früchten nachgewiesen, die unmittelbar nach der Ernte schockgefroren worden waren (d.h. den Gewächshausproben). Es ist nicht auszuschließen, dass bereits das Pflücken der Kaffeekirsche vom Baum eine ICL-Expression und damit Keimungsvorgänge induziert. Dies setzt eine Kommunikation zwischen Frucht und Mutterpflanze voraus, wie sie beispielsweise über Phytohormone denkbar ist. Eine genaue Analyse dieses Phänomens konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden.

3.1.3 Auftreten eines Stressmetabolismus

Sowohl die nasse als auch die trockene Aufbereitung von Kaffee beinhalten eine Trocknung der frischen Bohnen von anfänglich etwa 50 % Wasseranteil auf ca. 12 %. Da es sich bei den zu trocknenden Kaffeesamen um lebende Organismen handelt, ist anzunehmen, dass die Samen auf den Wasserentzug mit einer physiologischen Antwort reagieren. Eine entsprechende Stressantwort wurde in Form einer Akkumulation von γ -Aminobuttersäure (GABA) bereits von BYTOF (2003) nachgewiesen [15]. Die durch enzymatische Decarboxylierung von Glutaminsäure gebildete GABA stellt im Pflanzenreich einen gängigen Stressmetaboliten dar [104].

Die Hauptroute der GABA-Synthese läuft über die direkte und irreversible Decarboxylierung von Glutaminsäure durch Glutamatdecarboxylase (GAD) (EC 4.1.1.15). Die Aktivierung von GAD kann nach KINNERSLEY und TURANO (2000) über zwei Mechanismen erfolgen [105]. Zum einen kann ein Absinken des pH-Wertes im Cytosol eine Aktivitätssteigerung zur Folge haben. Ein solches pH-Wert-Absinken ist häufig korreliert mit Sauerstoffmangel oder mechanischer Zellzerstörung. Zum anderen kann eine Aktivierung auch im Neutralen erfolgen. In diesem Fall über den Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex, der nach einem durch verschiedene Stressoren verursachten Anstieg des Ca^{2+} -Spiegels im Cytosol gebildet wird. Die nachfolgende reversible Transaminierung von GABA mit Pyruvat oder 2-Oxoglutarat katalysiert durch GABA-Transaminase (EC 2.6.1.19) resultiert in der Produktion von Succinatsemialdehyd und Alanin (oder Glutamat). Ersteres Produkt kann durch Succinatsemialdehyddehydrogenase (SSADH, EC 1.2.1.16) oxidiert werden und so

Succinat bilden, einem wichtigen Krebs-Zyklus-Intermediat. Die Umwandlung von Kohlenstoff der Glutaminsäure zu Succinat durch diese drei Reaktionen wird als *GABA-Shunt* bezeichnet [106, 107].

BYTOF (2003) [15] stellte die Hypothese auf, dass die von ihm vorrangig in trocken aufbereiteten Bohnen beobachtete Akkumulation daher rührt, dass die nass aufbereiteten Bohnen wegen der Entfernung der Fruchthülle schneller getrocknet werden können und daher der Zeitraum für eine umfangreiche Stressantwort zu kurz ist, da nass aufbereitete Bohnen bereits nach einem Tag Trocknung nur noch ca. 25 % Wasser enthalten. Dies ist in etwa die untere Grenze für einen aktiven Stoffwechsel [90]. In seiner Arbeit beschrieb BYTOF (2003) zusätzlich einen Rohkaffee mit extrem hohem GABA-Gehalt (*Mbuni*) [15], dessen Trocknung durch Regenfälle stark verlangsamt wurde. Dadurch konnte seiner Meinung nach der Stoffwechsel länger aktiv bleiben und der Stressmetabolit wurde ungewöhnlich stark akkumuliert [15]. Es wurde ein direkter Zusammenhang zwischen dem zeitlichen Verlauf der Trocknung und der Stressantwort vermutet, ohne dass jedoch entsprechende Daten über den Gesamtverlauf der Aufbereitung dieses belegen konnten.

In dieser Arbeit wurden die GABA-Gehalte von Rohkaffees, die durch nasse bzw. trockene Aufbereitung hergestellt worden waren, analysiert. Um die Hypothese zu überprüfen, dass der Trocknungsverlauf für Art und Umfang der Stressantwort maßgeblich ist, wurden außerdem die entsprechenden Wassergehalte bestimmt.

Die Analysen zeigen einen drastischen Anstieg der GABA-Gehalte in den Samen während einer trockenen Laboraufbereitung - bis der Wassergehalt auf etwa 10 bis 15 % gefallen ist. Dieser Anstieg, im Zuge der trockenen Aufbereitung, ist so stark ausgeprägt, dass GABA im Spektrum der freien Aminosäuren von einer Minor-Aminosäure zu einer Major-Aminosäure wird (siehe Abb. 32). Dies wurde bereits von BYTOF (2003) beschrieben und kann hier bestätigt werden. Die Ergebnisse der Analysen zum GABA-Gehalt sind ein klarer Beleg für eine hohe physiologische Aktivität im Samen und dessen Fähigkeit, auf seine Umwelt metabolisch – hier mit einem durch den sinkenden Wassergehalt im Samen ausgelösten Trockenstressmetabolismus – zu reagieren. Die Analysen der parallel durchgeführten nassen Laboraufbereitungen zeigen, dass dieser Metabolismus nicht nur auf die trockene Aufbereitung beschränkt ist, allerdings bei nasser Aufbereitung deutlich weniger ausgeprägt ist (siehe Abb. 32 und Abb. 33).

Die folgenden Arbeiten sind von Frau Antje Müller im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt worden [108].

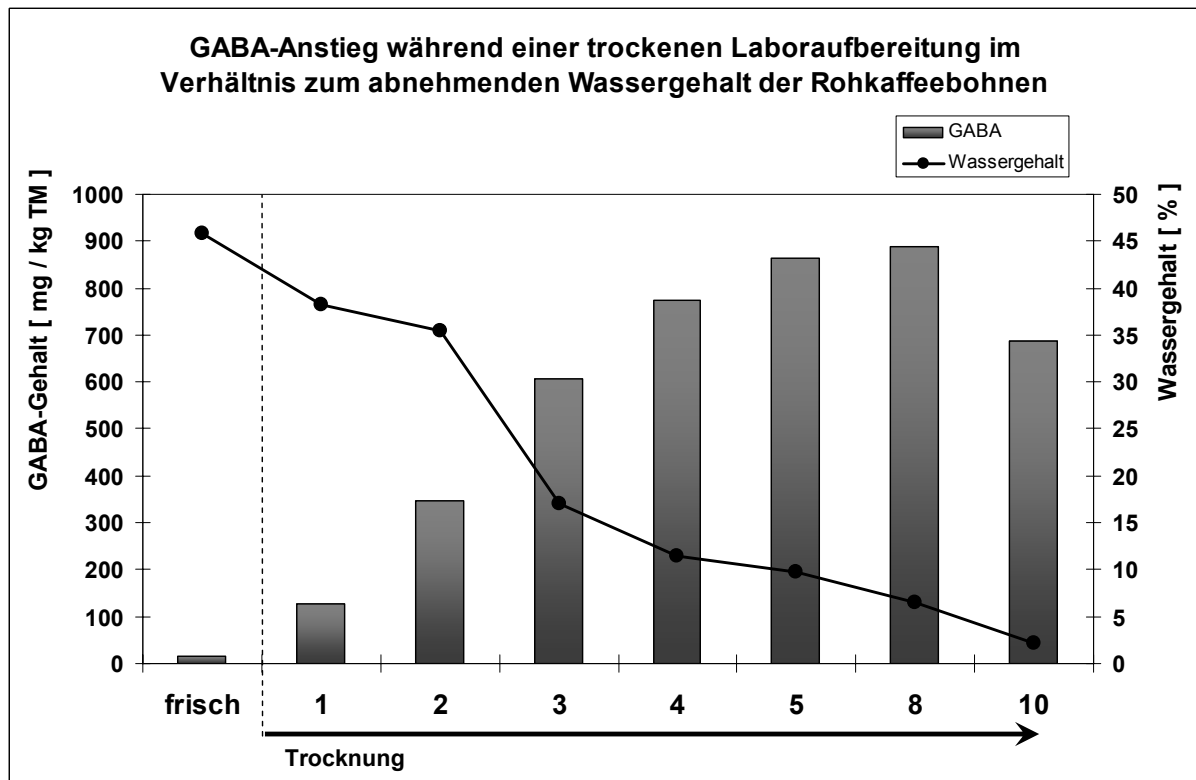


Abb. 32: Anstieg des GABA-Gehaltes während fortschreitender Trocknung (trockene Laboraufbereitung, Trocknungstemperatur 40°C, 12 h täglich).

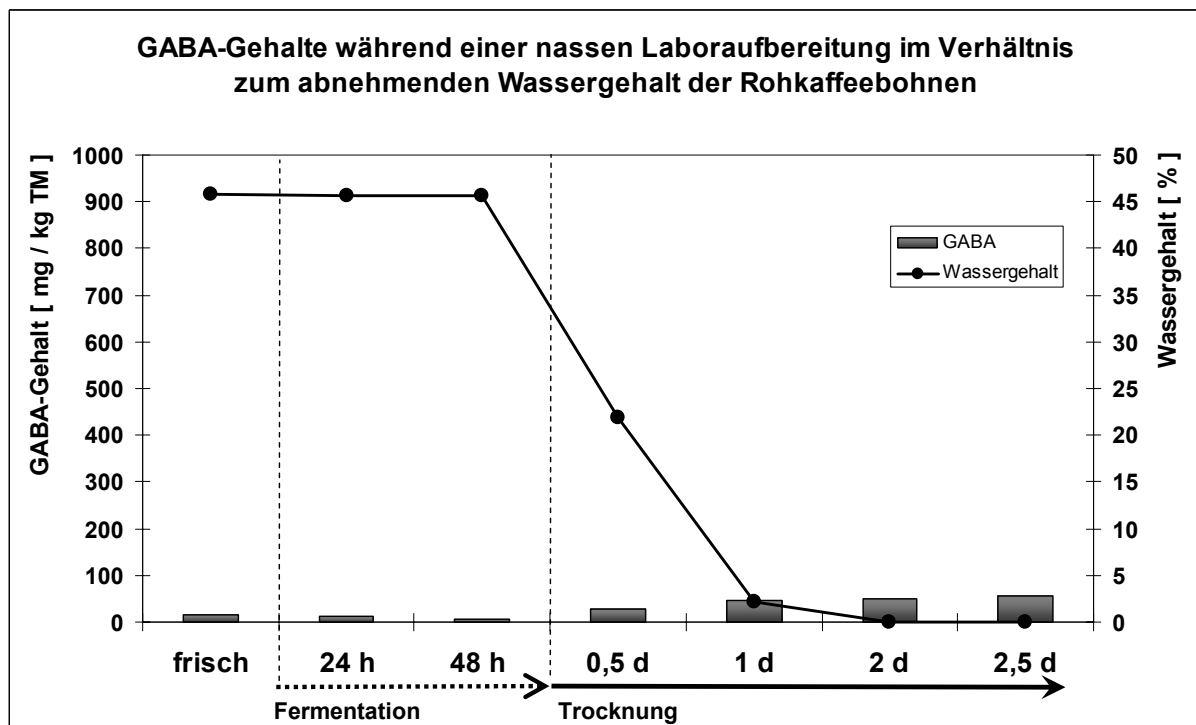


Abb. 33: GABA-Gehalte während einer nassen Aufbereitung (nasse Laboraufbereitung, Fermentation in 10 cm Schichthöhe, Wasserwechsel etwa alle 12 h, anschließende Trocknungstemperatur 40°C, 12 h täglich).

Die Vermutung, dass die Stressantwort vor allem während derjenigen Phase auftritt, in der der Wassergehalt über 25 % beträgt, hat sich als grundsätzlich zutreffend erwiesen; allerdings sind auch bei geringeren Wassergehalten noch Zuwächse im GABA-Gehalt zu verzeichnen. Dies kann daran liegen, dass der angegebene Wassergehalt sich auf die Durchschnittswerte der gesamten Bohnen bezieht. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Bohnen ungleichmäßig austrocknen und in einzelnen Kompartimenten noch höhere Wassergehalte vorhanden sind. Dort könnte dann noch aktiver Stoffwechsel stattfinden⁷.

Um zu ergründen, ob es sich bei der GABA-Akkumulation um eine auf den Samen beschränkte oder um eine auch in anderen prominenten Organen der Kaffeepflanze vorkommende Stoffwechselreaktion handelt, wurde der GABA-Gehalt auch in den Blättern der Kaffeepflanze bestimmt.

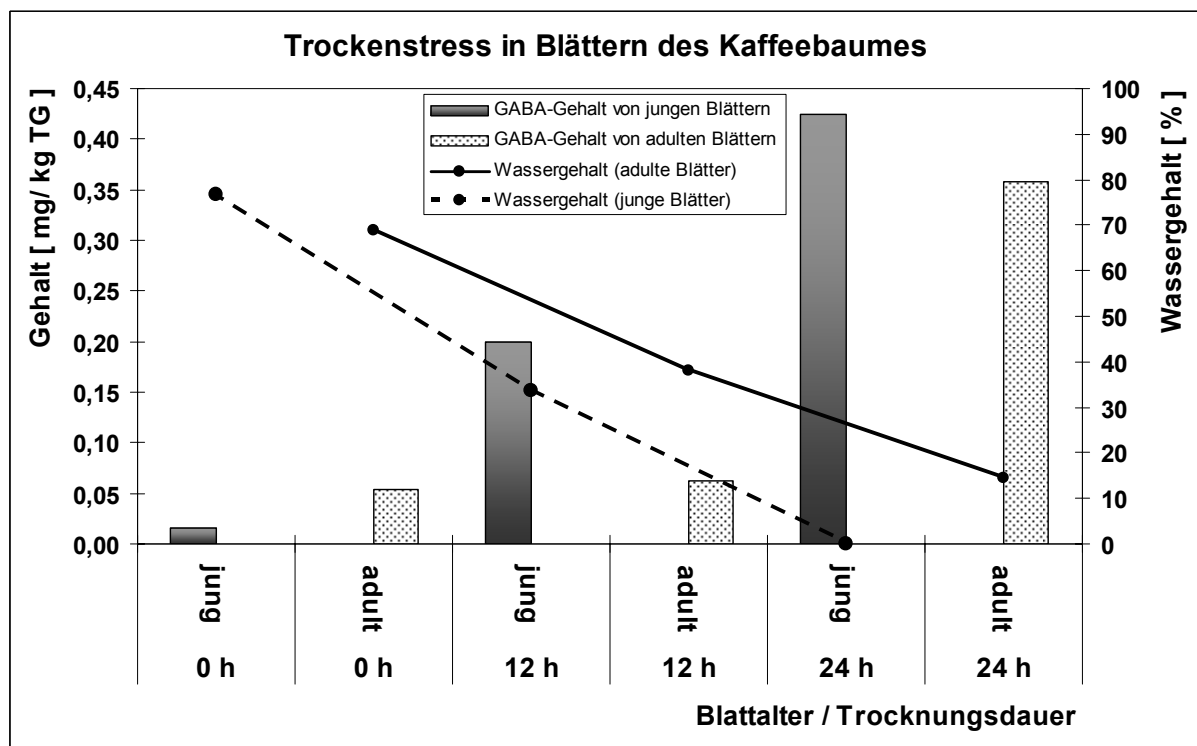


Abb. 34: GABA-Gehalte in Blättern eines Kaffeebaumes (*Coffea arabica* L.) aus den Räumen des Instituts für Pflanzenbiologie.

Die Analysen ergaben, dass GABA in turgeszenten frischen Blättern, ähnlich wie in den frischen Samen, zu den Minor-Aminosäuren gehört. Setzt man jedoch frische junge bzw. frische adulte Blätter einem Wasserstress aus, in dem man sie in einem Labortrockenschrank bei 30°C trocknet, so reagieren auch sie mit einer

⁷ Da bisher keine Untersuchungen darüber vorliegen, wo speziell bei Arabica-Kaffee während der Trocknung der kritische Wassergehalt liegt, unterhalb dessen der Stoffwechsel quasi zum Erliegen kommt, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass bei Kaffeesamen dieser Wert weit unterhalb der von Bewley und Black (1994) [90] als allgemeingültig genannten 25 %-Marke liegt.

starken GABA-Akkumulation (Abb. 34). Auf den ersten Blick scheint die Stressreaktion bei jungen Blättern heftiger auszufallen, als bei adulten. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass letztere naturgemäß einen höheren Anteil an Trockenmasse aufweisen (Bezugsgröße).

Durch die GABA-Bestimmungen konnte also eindeutig ein Stressmetabolismus sowohl in den Kaffeesamen während der Aufbereitung als auch in den Blättern der Kaffeepflanze nachgewiesen werden. Diese Reaktion auf den Trockenstress belegt erneut die Annahme, dass es sich bei den Rohkaffeebohnen während der Aufbereitung um metabolisch aktive Samen handelt, die sich je nach Aufarbeitungsart stark in ihrem physiologischen Status unterscheiden. Dabei ist nunmehr verdeutlicht worden, dass die Unterschiede im Stoffwechselstatus nicht nur den Keimungsstoffwechsel, sondern auch eine andere Grundform des Stoffwechsels betrifft: Stressmetabolismus als Antwort auf eine sich nachteilig verändernde Umweltsituation.

3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen zum physiologischen Status der Kaffeesamen während der Aufbereitung

Die bislang dargestellten Ergebnisse zeigen, ...

- 1.) dass Kaffeesamen, die der Aufbereitung unterworfen sind, aktiven Keimungsstoffwechsel aufweisen. Dieses konnte belegt werden durch:
 - a) Der Gehalt an 4C-Nuclei in den Embryos der Kaffeesamen steigt während der Aufbereitung an, was auf eine Wiederaufnahme des Zellzyklus hinweist.
 - b) Im Zuge der Nacherntebehandlungen kommt es in den Embryos der Kaffeesamen zu einer β -Tubulin-Synthese, die ebenfalls mit einer Wiederaufnahme des Zellzyklus assoziiert werden kann.
 - c) Es konnte eine Expression von ICL, einem keimungsspezifischen Enzym, im Zuge der Nacherntebehandlungen nachgewiesen werden.
- 2.) dass Kaffeesamen, die der Aufbereitung unterworfen sind, im Zuge der Aufbereitungen einen Stressmetabolismus aufweisen. Dies konnte belegt werden durch:
 - a) Während der Aufbereitung (vor allem der Trocknung) kommt es zu einer Akkumulation der als Stressmetabolit bekannten, nicht proteinogenen Aminosäure GABA.

- 3.) dass die unter 1.) und 2.) aufgeführten Phänomene in ihrem Ausmaß und ihrem Verlauf unterschiedlich und vor allem aufbereitungsspezifisch sind.

Die Tatsache, dass es während der nassen Aufbereitung zu Keimungsvorgängen kommt, bestätigt die eingangs erwähnte Hypothese hinsichtlich einer Keimungsinduktion im Zuge von Fruchtfleischentfernung und Fermentation. Wie erwartet, kommt der deutliche Keimungsstoffwechsel zum Erliegen, sobald in Folge des Wasserentzugs nur noch eine geringe Stoffwechselaktivität möglich ist. Überraschend hingegen ist der Befund, dass auch bei trocken aufbereiteten Kaffeesamen ein Keimungsmetabolismus auftritt, obwohl die äußeren Fruchthüllen erst nach Abschluss der Behandlung entfernt werden. Es ist zu vermuten, dass die keimungshemmenden Prinzipien zwar zu Beginn der Behandlung noch wirken, jedoch mit zunehmender Eintrocknung des Fruchtfleisches nicht mehr wirksam sind, sodass ein Keimungsstoffwechsel auch hier stattfinden kann. Da der Wassergehalt dann jedoch auch im Samen bereits deutlich reduziert ist, treten die Keimungsvorgänge nicht nur zeitlich verschoben, sondern auch in deutlich geringerer Ausprägung zu Tage. Entsprechend finden sich bei den Aufbereitungen bezüglich der untersuchten Keimungsparameter stets wiederkehrende Muster. So ist bei nasser Aufbereitung sowohl bei den Untersuchungen zum Zellzyklus wie auch zu den keimungsspezifischen Enzymen stets früh eine hohe Aktivität zu verzeichnen, die dann jedoch auch schneller zum Erliegen kommt, weil der Wasserverlust während der Trocknung *em pergamino* (im Endokarp) schneller voranschreitet als während der Trocknung *em coco* (= in der gesamten Fruchthülle).

Diese metabolen Unterschiede könnten die Basis für die unterschiedlichen Qualitätsausprägungen von nass und trocken aufbereiteten Rohkaffees sein. Ob sie sich auf der Ebene der Stoffe, die maßgeblich zum Aromapotential beitragen, niederschlagen, wird in Kapitel 3.3 untersucht.

Zunächst soll jedoch der physiologische Status der Rohkaffeebohnen während der Lagerung untersucht werden, die streng genommen noch der Nacherntebehandlung zuzuordnen ist.

3.2 Bestimmung des physiologischen Status der Kaffeesamen während der Lagerung

Die bei der Aufbereitung ablaufenden Stoffwechselvorgänge – wie die eben dargelegten Keimungsvorgänge oder der Stressmetabolismus – kommen im Zuge der Trocknung der Bohnen auf ~12 % Restfeuchte zum Halten. In den trockenen Bohnen sind prinzipiell nur geringe Stoffwechselaktivitäten während der Folgezeit zu erwarten. Dennoch stellt die Lagerung eine sensible Phase im Hinblick auf Qualitätserhaltung dar.

So kommt es insbesondere bei unsachgemäßer Lagerung von Rohkaffee zu oxidativen und hydrolytischen Veränderungen der Inhaltsstoffe, an denen auch Mikroorganismen beteiligt sind [17-24]. Aber auch bei sorgfältiger Lagerung, bei der ein Wachstum von Mikroorganismen kaum eine Rolle spielt [109], ist Rohkaffee nur begrenzt haltbar; überlang gelagerte Kaffees weisen häufig eigentümliche "off-notes" auf [28]. Wie bereits dargelegt, verlieren die Samen im Zuge der Lagerung ihre Keimfähigkeit [110]. In früheren Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen dem Verlust der Vitalität und Keimfähigkeit und den genannten Qualitätseinbußen diskutiert [27, 28]. Bislang liegen keine systematischen Untersuchungen darüber vor, in welchem zeitlichen Verlauf diese Prozesse ablaufen. Daher soll in diesem Abschnitt untersucht werden, wann die Kaffeesamen im Zuge der Lagerung die Keimfähigkeit einbüßen und ob diese Vorgänge in einem Zusammenhang mit der jeweiligen Aufbereitungsmethode stehen. Des Weiteren soll exemplarisch die Aktivität von hydrolytischen Enzymen untersucht werden, die *prae-* und *postmortem* einen Einfluss auf die Zuckergehalte haben könnten.

3.2.1 Bestimmung der Vitalität

Unter natürlichen Bedingungen, in der eingetrockneten, langsam verrottenden Frucht belassen, behalten Kaffeesamen ihre Vitalität weit über ein halbes Jahr hinaus [111]. Unter speziellen Lagerungsbedingungen für Kaffeesaatgut (d.h. bei einem Feuchtigkeitsgehalt von etwa 41 % (FM) in luftdichten PET-Beuteln bei konstant 15°C) können es sogar mehrere Jahre sein [26, 112]. Allerdings findet die langfristige Lagerung von kommerziellem Rohkaffee unter vollkommen anderen Bedingungen statt. Das heißt, die Bohnen sind vollständig geschält und ihr Feuchtegehalt soll bei maximal 12 % liegen. Die frühere Praxis, gewaschene Arabicas (d.h. Arabicas aus nasser Aufbereitung) während der Verschiffung und Lagerung bis kurz vor der Röstung in der Pergamentschicht zu belassen, wird heute nicht mehr angewandt, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass auf diese Weise weniger Qualitätsverluste auftreten [8]. Es ist bekannt, dass unter den heute üblichen Lagerungsbedingungen die Lebensfähigkeit von Kaffeesamen nur einige Wochen bis wenige Monate erhalten bleibt [76]. Detaillierte Untersuchungen liegen bisher jedoch nicht vor. Bislang ist auch völlig unklar, ob sich aufbereitungsbedingte Unterschiede

der Vitalität während der Lagerung von Rohkaffee nachweisen lassen. Diese Frage soll im Folgenden geklärt werden.

Grundsätzlich ist der einfachste Weg zur Bestimmung der Vitalität eines Samens ein Keimungstest. Leider birgt ein derartiger Test vor allem bei Kaffee einige Nachteile in sich: Ein Problem besteht darin, dass der Zeitbedarf für die Keimung von Kaffeesamen sehr unterschiedlich sein kann. So ist erfahrungsgemäß, eine prinzipielle Keimungsreaktion vorausgesetzt, der Zeitraum zwischen Quellung der getrockneten Bohnen und sichtbarem Abschluss der Keimung (Durchbruch der Radicula) umso länger, je länger der Samen gelagert worden ist. Dies kann bis zu mehrere Wochen in Anspruch nehmen. Des Weiteren können über einen Keimungstest keine Aussagen zu partiellen Schädigungen der Samen gemacht werden und es ist keine Differenzierung zwischen Embryo und Endosperm möglich. Aus diesen Gründen wurde die Vitalität der Kaffeesamen über die Inkubation mit Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) erfasst. TTC ist ein Reagenz mit dem biologische Reduktionsvorgänge sichtbar gemacht werden können. Intakte Zellen nehmen das TTC auf und reduzieren es. Das tiefrote Reduktionsprodukt Triphenylformazan (siehe Abb. 14) zeigt vitales Gewebe an. Anschließend wird die aufgetretene Rotfärbung in Geweben und Gewebeschnitten bestimmt und so die Vitalität der Samen ermittelt (siehe Abb. 15). Zur Quantifizierung wird die Anzahl der vitalen, gefärbten Bohnen einer Probe derjenigen der abgestorbenen, nicht gefärbten gegenübergestellt. Der TTC-Test wurde bereits früher zur detaillierten Untersuchung der Korrelation zwischen Keimfähigkeit der Kaffeesamen und der Vitalität von Kaffeeembryos verwendet [80, 113, 114]. Allerdings liegen bislang keine Untersuchungen über den zeitlichen Verlauf der Veränderungen der Vitalität im Laufe der Lagerung vor.

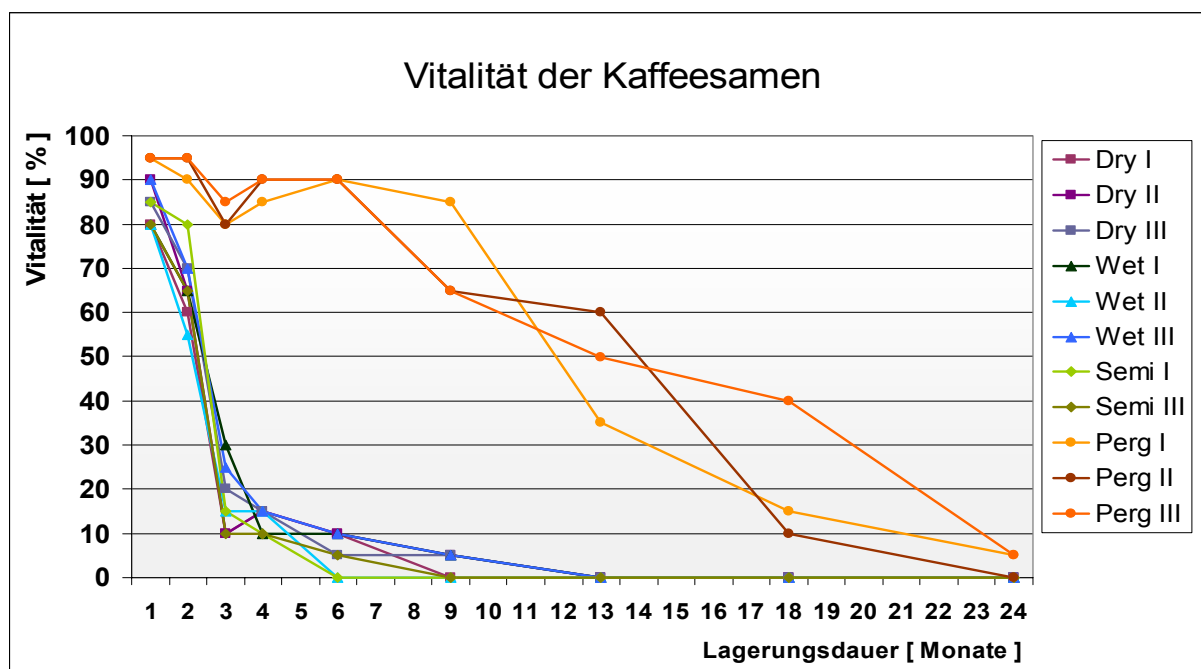


Abb. 35: Ergebnisse der Vitalitätstests während der Lagerung von Rohkaffee.

Die Ergebnisse zeigen, dass nass und trocken aufbereiteter Kaffee innerhalb der ersten drei Monate sehr stark an Vitalität verliert (siehe Abb. 35). Nach etwa einem Jahr sind praktisch alle Samen abgestorben. Dieses Ergebnis stimmt mit Berichten zur Keimfähigkeit überein [76, 115]. Im Gegensatz hierzu behalten die Samen, die in ihrer Pergamenthülle gelagert wurden, ihre Keimfähigkeit wesentlich länger. Während in den Populationen der geschälten Samen nach drei Monaten nur noch 10 bis 30 % der Kaffeesamen vital sind, weisen die Populationen des Pergamentkaffees kaum reduzierte Vitalitätswerte auf. Nach einem Jahr der Lagerung sind in den Populationen der geschälten Kaffees keine vitalen Samen mehr zu finden. Innerhalb der Populationen der ungeschälten Kaffees hingegen beträgt die Vitalitätsrate 35 bis 60 %. Selbst nach 24 Monaten waren in diesen Populationen noch geringe Anteile vitaler Samen (unterhalb 10 %) zu finden. Der Zeitpunkt, an dem noch etwa 50 % der untersuchten Kaffeesamen vital waren, lag bei den geschälten Rohkaffees bei zwei bis drei Monaten Lagerung, während er bei den ungeschälten bei 12 bis 15 Monaten lag.

Innerhalb der gelagerten geschälten Rohkaffees ließen sich im Hinblick auf den Verlauf der Vitalitätsabnahme während der Lagerung keine signifikanten aufbereitungsspezifischen Unterschiede feststellen. Dagegen ist der Effekt einer Lagerung im Parchment auf die Vitalität enorm. Das Ergebnis dieses Versuches hat einen sehr hohen Stellenwert in Bezug auf die Qualitätserhaltung von Rohkaffees, da ein enger Zusammenhang zwischen Vitalität der Bohne und der späteren Tassenqualität prognostiziert wird [28].

Sollten sich diese Zusammenhänge bestätigen, könnte sich für die Kaffeeindustrie die Rückkehr zur früher üblichen Praxis der Verschiffung und Lagerung als Pergamentkaffee als attraktiv erweisen.

3.2.2 Bestimmung der Aktivität von hydrolytischen Enzymen

Die im letzten Kapitel gefundenen Unterschiede in der Vitalität führen vor Augen, dass man es einerseits zu Beginn der Lagerung mit vitalen und andererseits, je länger die Lagerung dauert, mit abgestorbenen Organismen zu tun hat. Bei toten Zellen, wie sie in den abgestorbenen gelagerten Kaffeesamen vorkommen, kommt es zu Dekompartimentierung, wodurch insbesondere die cytosolischen Enzyme inaktiviert werden. Viele apoplastische Enzyme hingegen sind noch aktiv. Dies sind vor allem Hydrolasen. Wichtig für diese Untersuchungen sind vor allem solche Enzyme, die einen Einfluss auf die Gehalte an Aromavorstufen haben können.

Aufgrund der vermuteten Relevanz des Kohlenhydratstoffwechsels für das eingangs beschriebene Phänomen der Aromaverflachung (siehe Kapitel 1.2.3), soll der Schwerpunkt im Folgenden auf den Kohlenhydrat-spaltenden Enzymen liegen. Das Hauptspeichergewebe der Kaffeesamen ist das Endosperm. Der Kohlenhydrat-Speicher besteht hauptsächlich aus (Galacto-) Mannanen, die in den massigen Zellwänden des Endosperms akkumuliert sind [116-118]. Dabei handelt es sich um

ein langkettiges 1,4- β -Mannan, das an einigen Positionen einzelne 1,6-verknüpfte α -Galactosylreste als Seitenkette aufweist [116, 119]. Neben den Mannanen, die den Hauptanteil der polymeren Kohlenhydrate des Rohkaffees ausmachen, kommen noch geringe Mengen an Cellulose und Arabinogalactanen in den Kaffeesamen vor [31]. Am hydrolytischen Mannan-Abbau im Zuge von Keimung und Sämlingsentwicklung in Samen, deren Hauptspeicherkohlenhydrate Galactomannane darstellen, sind verschiedene Enzyme beteiligt: Während Endomannanasen die polymeren Kohlenhydrate zunächst zu relativ großen (Galacto-) Mannan-Bruchstücken zerkleinern, spalten β -Mannosidasen und α -Galactosidasen terminal Mannosyl- bzw. Galactosylreste aus den Seitenketten ab [120, 121]. Es ist unklar, ob eine Entfernung der Galactosylreste durch α -Galactosidasen unabdingbare Voraussetzung für eine Spaltung des Polymers durch Endo- β -mannanase ist, oder ob, insbesondere bei Mannanen mit relativ wenigen Galactosylseitenketten, ein sofortiger Abbau durch Endomannanasen möglich ist. Auch bei Arabica-Kaffee erfolgt der Abbau des Speichermannans prinzipiell nach diesem Schema; entsprechende Enzymaktivitäten sind im Kaffeesamen mehrfach nachgewiesen und untersucht worden [81, 122].

Es ist zu vermuten, dass sich die Enzymaktivität, die im lebenden Samen eng mit der physiologischen Aktivität im Organismus abgestimmt ist, nach Absterben der Samen, während der Lagerung in ihrer Ausprägung und Ausrichtung verändert. Im Gegensatz zum kontrollierten Abbau der (Galacto-) Mannane in den lebenden Samen kann es auch in den abgestorbenen Kaffeebohnen während der Lagerung zu einer unkontrollierten Hydrolyse der Reservekohlenhydrate kommen.

In diesem Teil dieser Arbeit soll zunächst die Aktivität der verschiedenen Enzyme bestimmt werden. Zusätzlich soll überprüft werden, ob die entsprechenden Hydrolyseprodukte nachweisbar sind und ob sie sich im Gehalt deutlich verändern. Letztere Ergebnisse werden ausführlich in Kapitel 3.3.2 dargestellt.

Die drei an der Mobilisierung des (Galacto-) Mannans der Kaffeesamen (Reservekohlenhydrat) im Wesentlichen beteiligten Enzyme Endo- β -mannanase(n) (EC 3.2.1.78), (Exo-) β -Mannosidase (EC 3.2.1.25) und α -Galactosidase (EC 3.2.1.22) sind relativ stabil, besonders bei Einsatz leicht saurer Extraktionsmedien. So ist es möglich, auch aus den sehr phenolreichen Kaffeesamen diese Hydrolasen in aktiver Form zu isolieren. Während die Aktivitätsbestimmungen von Endo-Glucosidasen recht aufwändig sind, können die Aktivitäten der (Exo)-Glucosidasen vergleichsweise einfach über Spaltung synthetischer Substrate (p-Nitrophenylglucoside) und anschließender photometrischer Bestimmung der Produktkonzentration ermittelt werden.

3.2.2.1 Endo- β -mannanase

Die Analysen der im Rahmen dieses Projektes anfallenden Proben wurden mit Hilfe eines Gel-Diffusionstests, der auf der Diffusion des Enzyms in einem mit Kongo-Rot angefärbten Substrat-Gel-Gemisch basiert, durchgeführt.

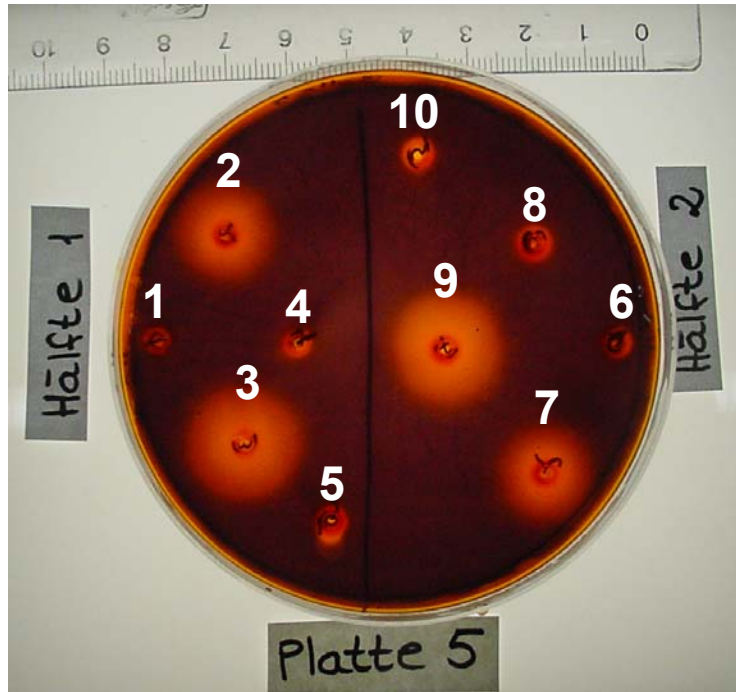


Abb. 36: Gel-Diffusionstest zur Bestimmung der Endo- β -mannanase-Aktivität in gequollenen Kaffeekeimlingen und in Kaffeesämlingen. Extrakte wurden aus frischen Kaffee-Keimlingen und -Sämlingen hergestellt. Als Blindprobe wurde der reine Puffer eingesetzt. Probenschlüssel siehe Tab. 11.

Tab. 11: Probenschlüssel zu Abb. 36. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Verdünnungsfaktor gegenüber dem unverdünnten Extrakt.

Spot	Platte 5
	Hälfte 1
1	6 Tage gequollene Kaffeesamen
2	Gekeimte Kaffeesamen (Radicula 3cm)
3	Kaffee-Sämlinge
4	Blindprobe
5	6 Tage gequollene Kaffeesamen
	Hälfte 2
6	6 Tage gequollene Kaffeesamen (1:100)
7	Gekeimte Kaffeesamen (Radicula 3cm)
8	Gekeimte Kaffeesamen (Radicula 3cm) (1:100)
9	Kaffee-Sämlinge
10	Kaffee-Sämlinge (1:100)

Um die Eignung des Enzymtests zu überprüfen und um ein Maß für die Aktivität zu erhalten, wurden die Tests zunächst an frischen Kaffeesämlingen durchgeführt. Kaffeesämlinge sind besonders geeignet, weil sie sich im Stadium der Reservekohlenhydratmobilisierung befinden und entsprechend hohe Enzymaktivitäten aufweisen sollten. Dabei zeigte sich, dass diese Methode geeignet ist, auch bei einzelnen Bohnen die Zunahme der Endo- β -mannanase-Aktivitäten im Verlauf von Keimung und Sämlingsentwicklung zu verfolgen (siehe Abb. 36). Der Radius des Hofes, der infolge der Hydrolysen konzentrisch um die zentrale Diffusionsquelle im Gel gebildet wird, ist proportional zur Enzymaktivität. Die unten gezeigte Platte (siehe Abb. 37) zeigt jedoch, dass es auch mit diesem Gel-Diffusionstest nicht möglich war, Endo- β -mannanase-Aktivität in gelagerten Rohkaffees nachzuweisen

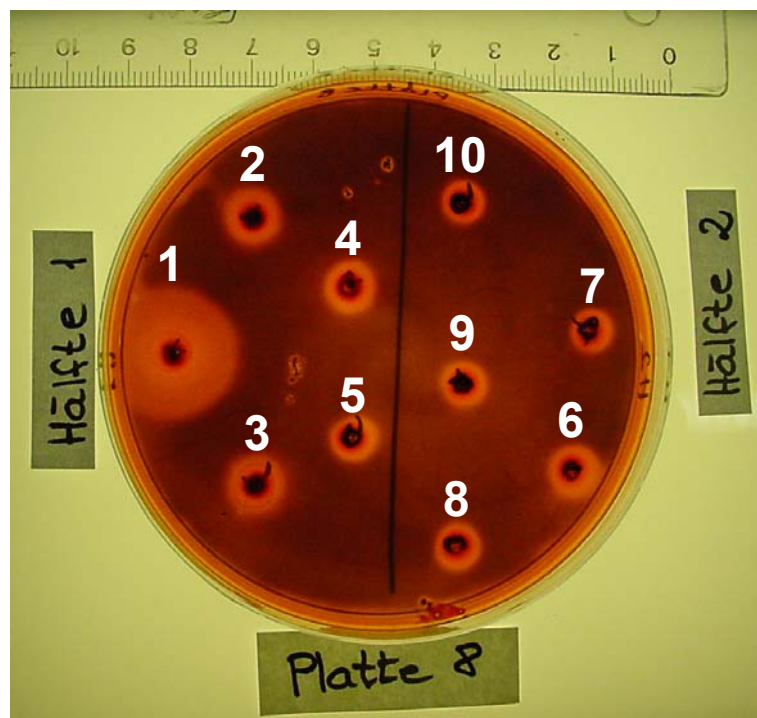


Abb. 37: Gel-Diffusionstest zur Bestimmung der Endo- β -mannanase-Aktivität in ungelagerten Rohkaffeeproben. Enzym-Extrakte wurden aus den ungelagerten Brasil-Proben („0 Monate“) hergestellt. Als Blindprobe wurde der reine Puffer eingesetzt. Probenschlüssel siehe Tab. 12.

Tab. 12: Probenschlüssel zu Abb. 37. Die Angaben in Klammern beziehen sich auf den Verdünnungsfaktor gegenüber dem unverdünnten Extrakt.

Spot	Platte 8	Spot	Platte 8
	Hälfte 1		Hälfte 2
1	semi-dry (S)	6	S (1:100)
2	nass (N)	7	N (1:100)
3	trocken (T)	8	T (1:100)
4	nass/pergamino (P)	9	P (1:100)
5	Blindprobe	10	Blindprobe

Lediglich in Spot 1 (unverdünnt) waren beträchtliche Enzymaktivitäten festgestellt worden, alle Übrigen unterschieden sich nicht von der Blindprobe (reiner Puffer). Der in Spot 1 festgestellte Hof mit großem Radius fällt aus der Betrachtung heraus. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die entsprechende Enzymaktivität nicht auf den eingesetzten Kaffeesamen selbst, sondern auf kontaminierende Schimmelpilze zurückzuführen ist. Endo- β -mannanasen sind in diversen Vertretern der Schimmelpilze nachgewiesen worden [123, 124] und das Vorhandensein dieser Pilze ist auf trocknendem Rohkaffee unter anderem von ROUSSOS (1995) und VINCENT (1987) beschrieben [124, 125]. Der Semi-dry-Prozess wird wegen der Gefahr derartiger Kontaminationen als problematisch angesehen. Auf Platten mit Nährmedien, auf denen Rohkaffeesamen von semi-dry aufbereitetem Kaffee ausgebracht wurde, ließen sich diverse Kontaminationen feststellen. Die Mikroorganismen wurden dabei nicht näher bestimmt.

Die gesamten Untersuchungen haben gezeigt, dass weder in frisch aufbereiteten noch in gelagerten Rohkaffeesamen signifikante Aktivitäten an Endo- β -mannanase vorhanden waren.

3.2.2.2 β -Mannosidase

Die in der Pflanze apoplastisch lokalisierte β -Mannosidase ist in der Lage, von den langkettigen (Galacto-)Mannanen terminal Mannose abzuspalten. Normalerweise ist sie bei der Reservestoffmobilisierung der Kaffeesamen der oben beschriebenen Endo- β -mannanase nachgeschaltet [126].

Bei der Bestimmung der β -Mannosidase zeigte sich, dass bei allen Proben während der Lagerung eine geringe aber deutlich nachweisbare Enzymaktivität vorhanden war. In frischen, direkt aus der Frucht präparierten Samen, wurden Aktivitäten auf vergleichbarem Niveau, wie in kurzzeitig gelagerten festgestellt. Allgemein unterliegen diese Werte hohen Schwankungen. Im Laufe der Lagerung war dennoch eine deutliche Tendenz eines Aktivitätsrückgangs feststellbar. Dabei wurden weder zwischen den Rohkaffees der verschiedenen Aufbereitungen noch zwischen den mit und ohne Pergamenthülle gelagerten Rohkaffees signifikante Unterschiede in der β -Mannosidase-Aktivität festgestellt. Eine Korrelation zwischen dem Verlust an Vitalität während der Lagerung und dem Rückgang der β -Mannosidase-Aktivität ist ebenfalls nicht zu verzeichnen.

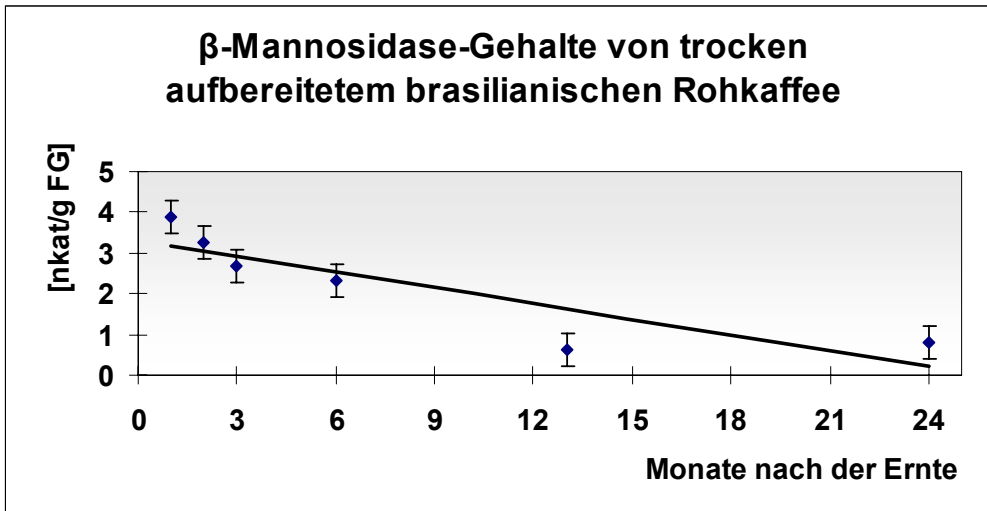


Abb. 38: β -Mannosidaseaktivität von trocken aufbereitetem Brasil-Kaffee während zweijähriger Lagerung.

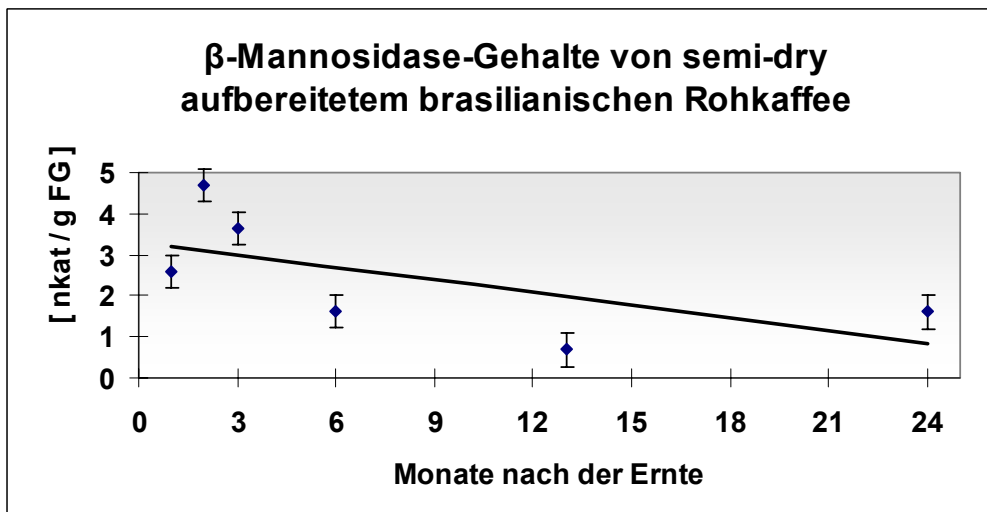


Abb. 39: β -Mannosidaseaktivität von semi-dry aufbereitetem Brasil-Kaffee während zweijähriger Lagerung.

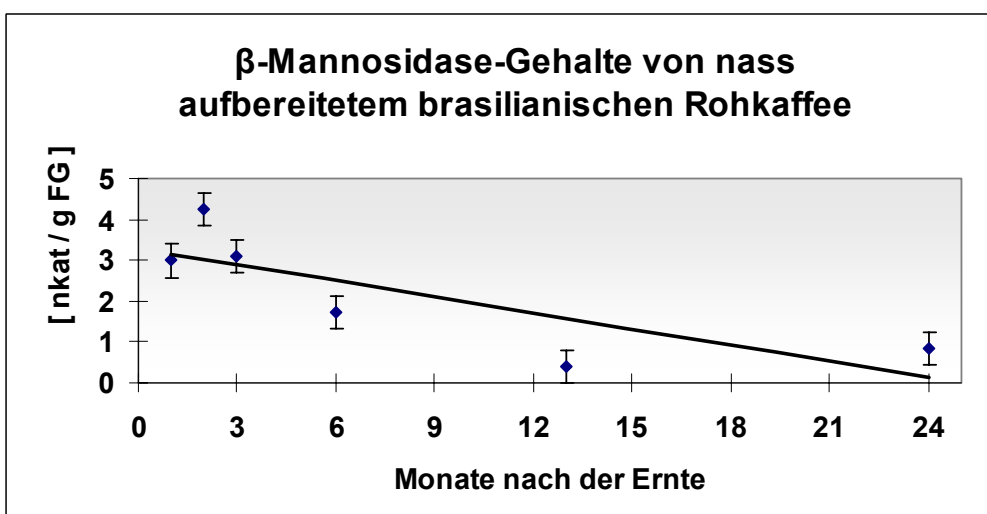


Abb. 40: β -Mannosidaseaktivität von nass aufbereitetem Brasil-Kaffee während zweijähriger Lagerung.

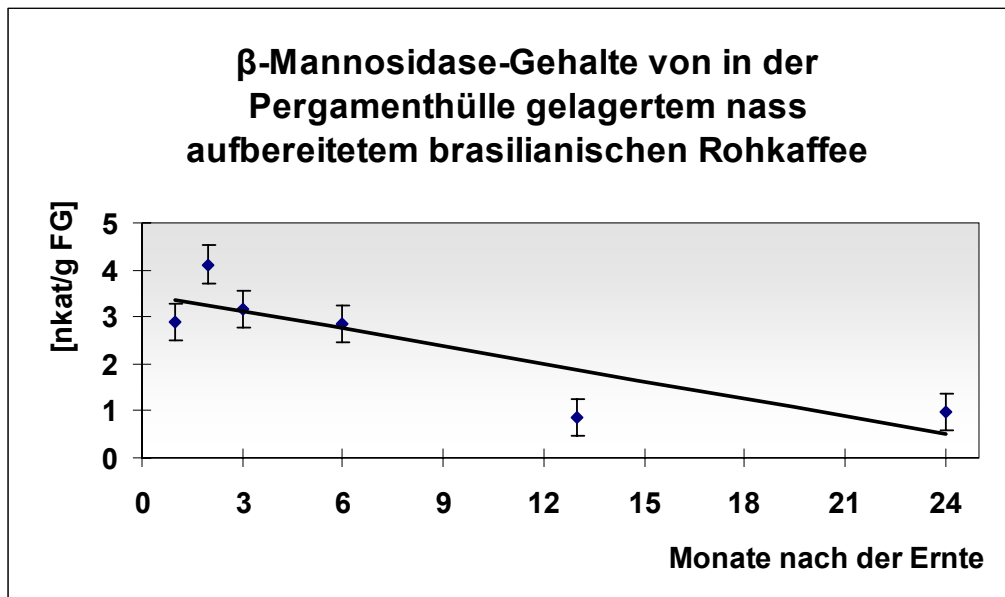


Abb. 41: β -Mannosidaseaktivität von nass aufbereitetem Brasil-Kaffee, der im Parchment gelagert wurde, während zweijähriger Lagerung.

3.2.2.3 α -Galactosidase

Die ebenfalls apoplasmatisch lokalisierte α -Galactosidase spaltet von den langkettigen (Galacto-)Mannanen Galactosylreste ab. Daneben vermag sie auch Galactosylreste von Stachyose und Raffinose abzuspalten [127, 128]. Sie ist somit in mehrfacher Hinsicht an der Reservestoffmobilisierung der Kaffeesamen beteiligt. Das Vorkommen von α -Galactosidase in Rohkaffee ist seit langem bekannt [50, 129, 130]. In der Medizin wird dieses aus Rohkaffee extrahierte Enzym dazu verwendet, durch eine einfache Abspaltung eines Galactosylrestes Blut der Blutgruppe B in Blut der Blutgruppe 0 umzuwandeln [131].

Bei der Bestimmung der α -Galactosidase zeigte sich, dass bei allen Proben eine im Vergleich zur β -Mannosidase etwa zehnfach höhere Aktivität nachweisbar war. Prinzipiell bestanden somit keine Unterschiede in der Aktivität zwischen gelagerten und frischen Kaffeebohnen. Fast immer war eine geringe Zunahme der Aktivität bis etwa drei Monate nach der Ernte messbar. Allerdings blieb unklar, ob diese Veränderungen signifikant waren. Zwar nahmen die Aktivitäten im Verlauf der Lagerung leicht ab, verblieben jedoch nach 24 Monaten auf deutlich höherem Niveau als dies bei der β -Mannosidase der Fall war.

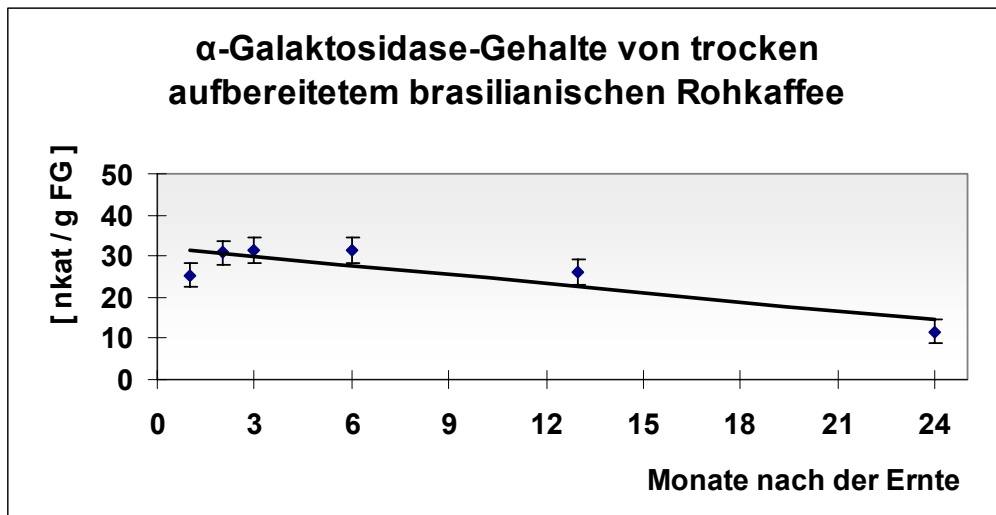


Abb. 42: α -Galactosidaseaktivität von trocken aufbereitetem Brasil-Kaffee während zweijähriger Lagerung.

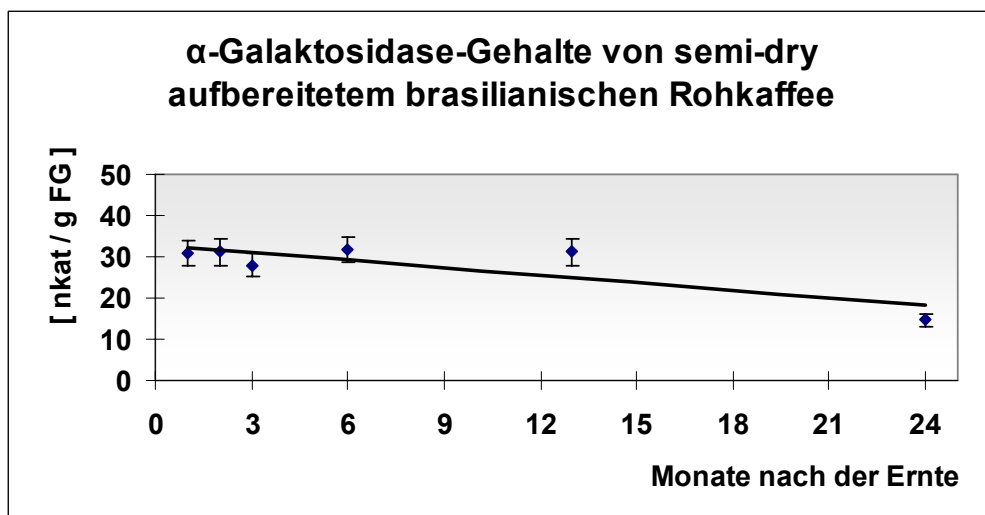


Abb. 43: α -Galactosidaseaktivität von semi-dry aufbereitetem Brasil-Kaffee während zweijähriger Lagerung.

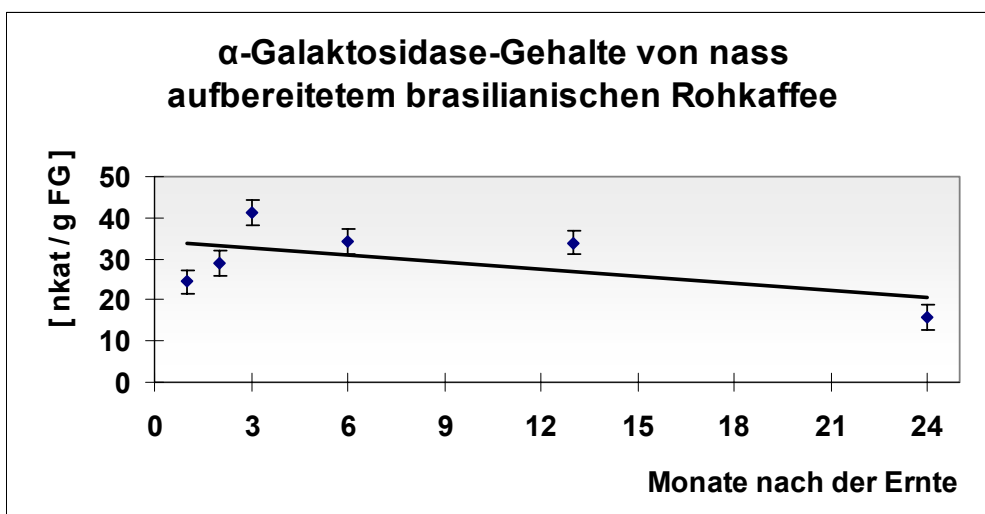


Abb. 44: α -Galactosidaseaktivität von nass aufbereitetem Brasil-Kaffee während zweijähriger Lagerung.

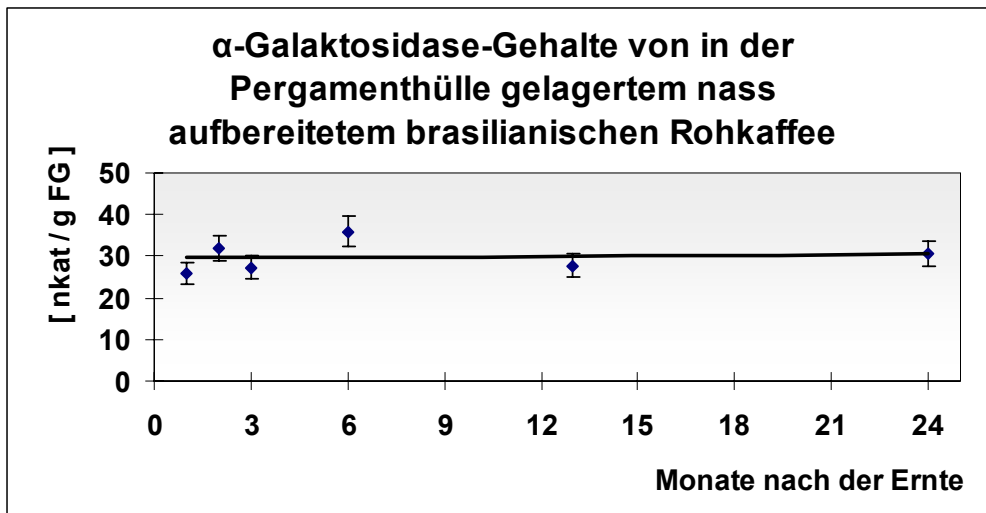


Abb. 45: α -Galaktosidaseaktivität von nass aufbereitetem Brasil-Kaffee, der im Parchment gelagert wurde, während zweijähriger Lagerung.

Bei dem im Parchment gelagerten Kaffee (siehe Abb. 45) war gar keine Abnahme feststellbar. Bei der Aktivität der α -Galactosidase ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rohkaffees der verschiedenen Aufbereitungen nachweisen. Allerdings besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der Erhaltung der α -Galactosidase-Aktivität und einer Lagerung im Parchment. Dennoch konnte keine Korrelation zwischen dem Verlust an Vitalität während der Lagerung und dem Rückgang der α -Galactosidase-Aktivität beobachtet werden.

3.2.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen zum physiologischen Status der Kaffeesamen während der Lagerung

Die Vitalitätstests ergaben völlig neue Erkenntnisse, was die Lagerungsbedingungen betrifft. So behalten im Parchment gelagerte Rohkaffeebohnen ihre Vitalität fast ein Jahr, während die ohne Parchment gelagerten bereits nach etwa drei Monaten abgestorben sind. Dennoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei den untersuchten hydrolytischen Enzymen:

- a) Endo- β -mannanase
Die Aktivität der Endo- β -mannanasen in gelagerten Kaffeesamen war kaum messbar und kann daher kaum für mögliche stoffliche Veränderungen verantwortlich gemacht werden.
- b) β -Mannosidase und α -Galactosidase
Bei diesen beiden Enzymen konnten im Zuge der Lagerung unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivitätsverluste beobachtet werden. Jedoch unterlagen die Bestimmungen der Aktivität dieser Enzyme starken Schwankungen. Allerdings war in allen Proben eine Rest-Aktivität während der gesamten Lagerung festzustellen.

Ferner konnte kein Zusammenhang zwischen Aufbereitungsform und der in den entsprechenden Rohkaffees gemessenen Enzymaktivität festgestellt werden. Es ergaben sich weiterhin keine Zusammenhänge zwischen der Vitalitätsrate in den Populationen der gelagerten Rohkaffees und der darin festgestellten Enzymaktivität.

3.3 Bestimmung wichtiger Aromavorstufen während Aufbereitung und Lagerung von Rohkaffee

Es ist zu erwarten, dass sich die im vorigen Kapitel unter dem Hauptaspekt der Vitalität beschriebenen Enzymaktivitäten maßgeblich auf die Zusammensetzung der niedermolekularen Kohlenhydrate auswirken. Gleichfalls ist zu vermuten, dass die von LUDWIG *et al.* (2000) in Kaffeesamen festgestellte Protease-Aktivität Einfluss auf den Gehalt und die Zusammensetzung der freien Aminosäuren haben [132]. Aminosäuren und Zucker gehen zum einen während der Röstung *Maillard*- und *Strecker*-Reaktionen ein [38, 133]; zum anderen entstehen aus Zuckern durch Karamellisierung und Fragmentierung weitere Aromastoffe und für den Geschmack wichtige Säuren [134].

3.3.1 Freie Aminosäuren

Die Gehalte an freien Aminosäuren von Rohkaffee (*Coffea arabica* L.) offenbaren eine große Variabilität zwischen den einzelnen Untersuchungsreihen, sowohl zwischen verschiedenen Provenienzen als auch innerhalb einer Provenienz von Erntejahr zu Erntejahr [15, 47, 66, 68]. Die Ursachen hierfür sah BYTOF (2003) [15] einerseits – soweit es Rohkaffees unterschiedlicher Herkunft betraf – vor allem in den unterschiedlichen Bedingungen während der Wachstumsphase. Bei Rohkaffees gleicher Herkunft muss nach BYTOF ein aktiver Metabolismus, der in den Kaffeesamen während der Aufbereitung abläuft, für die unterschiedlichen Aminosäuregehalte verantwortlich gemacht werden. Er belegt dies insbesondere mit einer Stressreaktion, die zur Akkumulation von GABA in trocken aufbereiteten Rohkaffees führt [16]. Dass pflanzliche Samen auf eine Trocknung unter anderem auch mit Aminosäure-Akkumulation reagieren können, ist auch aus anderen Untersuchungen bekannt [135].

Im Folgenden soll untersucht werden, inwieweit sich in parallel aufbereiteten Rohkaffeeproben aufbereitungs- und lagerungsbedingte Unterschiede in den freien Aminosäuren nachweisen lassen. Die freien Aminosäuren wurden in Rohkaffees während zweier Abschnitte der Nacherntebehandlung intensiv untersucht: Zum einen im Zuge der Aufbereitung an sich, wobei die betreffenden Proben aus Laboraufbereitungen stammen, und zum anderen während der Lagerung, anhand von Rohkaffees, die aus Feldversuchen im Anbaugebiet resultieren (siehe auch Kapitel 2.2). Die Ergebnisse werden daher ebenfalls in zwei Abschnitten, dem Einfluss der Aufbereitung und dem der Lagerung, präsentiert.

3.3.1.1 Aminosäuregehalte während der Aufbereitung von Rohkaffeebohnen

Während der Aufbereitungen verhalten sich die Gehalte an freien proteinogenen Aminosäuren bei der nassen und der trockenen Aufbereitung jeweils unterschiedlich. Prinzipiell weisen die Kaffeesamen in beiden Fällen der Behandlung eine hohe Dynamik im Pool der freien Aminosäuren auf. Allerdings ergeben sich grundsätzlich unterschiedliche Muster sowohl bei ausschließlicher Betrachtung der proteinogenen Aminosäuren, als auch bei zusätzlicher Berücksichtigung der nichtproteinogenen Aminosäure GABA.

In den Kaffeesamen beider Aufbereitungen steigen die Gesamtgehalte während der Aufbereitung an. Während der Anstieg bei nasser Aufbereitung ungefähr 40 % beträgt, erfolgt bei trockener Aufbereitung sogar eine Zunahme von über 70 %. Dabei fällt auf, dass bei trockener Aufbereitung der Hauptanteil auf die nicht proteinogene Aminosäure GABA zurückgeht, wohingegen GABA bei nasser Aufbereitung im Gesamtgehalt der freien Aminosäuren nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ein Netto-Abfall in der Konzentration der freien Aminosäuren, wie er von BYTOF (2003) festgestellt wurde [15], konnte weder für die nasse noch für die trockene Aufbereitung bestätigt werden.

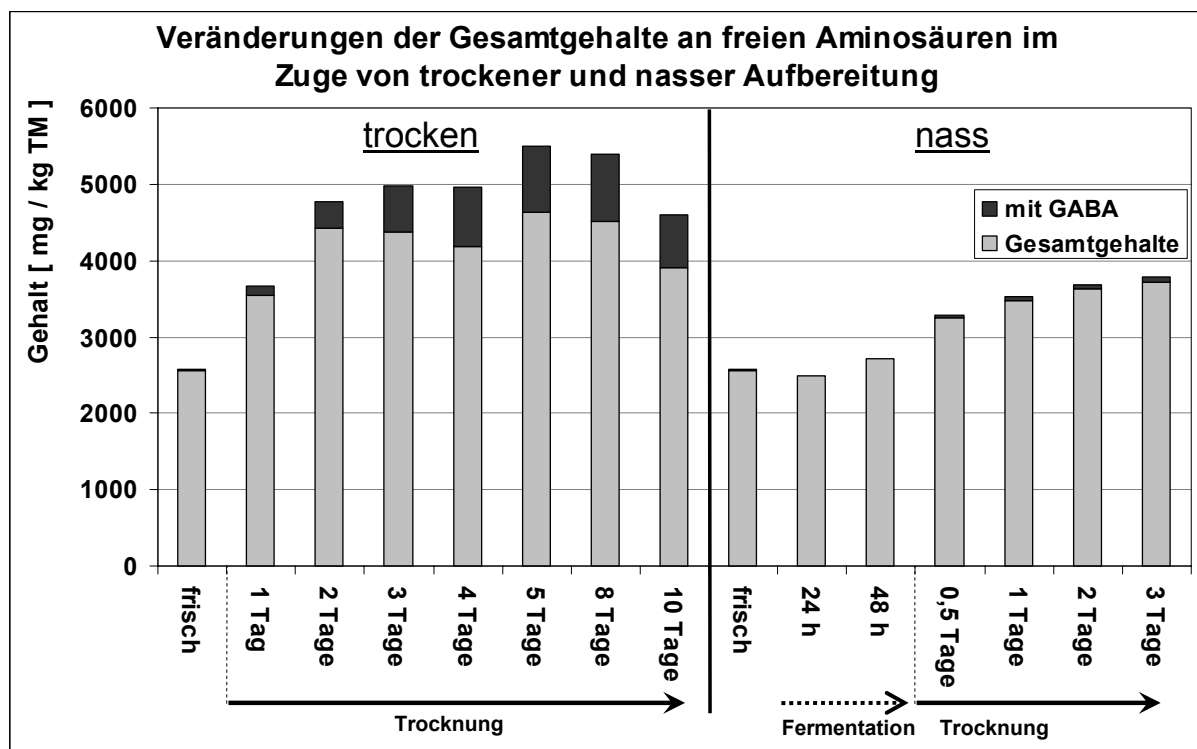


Abb. 46: Entwicklung der Gesamtaminosäuregehalte von Rohkaffeebohnen von parallel nass und trocken aufbereiteten Arabica Rohkaffees während der jeweiligen Aufbereitung mit und ohne Berücksichtigung der nichtproteinogenen Aminosäure GABA.

BYTOF (2003) diskutierte den möglichen Verlust von freien Aminosäuren während der nassen Aufbereitung, speziell während der Fermentation. Dies kann auch hier nicht völlig ausgeschlossen werden, da der Verlust nicht messbar wäre, wenn die gleichzeitige Mobilisierung von freien Aminosäuren im Samen höher oder gleich dem Verlust an Aminosäuren an das umgebende Medium ist. Eine genaue

Quantifizierung derartiger Verluste ist unter den nicht sterilen Bedingungen einer Kaffeefermentation kaum möglich.

Zur Untermauerung dieser Daten sind im Folgenden noch einige Aminosäuren-Verläufe im Zuge beider Aufbereitung exemplarisch dargestellt (siehe Abb. 47 und Abb. 48). Die extremen Veränderungen im Gehalt von GABA sind aus Abb. 46 ersichtlich.

Die Betrachtung von individuellen Aminosäuren zeigt, dass die Veränderungen nicht für alle Aminosäuren gleich verlaufen: Während bei der nassen Aufbereitung bei den meisten Aminosäuren ein mehr oder weniger starker Anstieg zu verzeichnen ist, können Asparagin und Serin als Beispiele dafür herangezogen werden, dass einzelne Aminosäuren in der Konzentration anfänglich zurückgehen. Dieser Rückgang bezieht sich jedoch nur auf die Phase der Fermentation, denn mit Beginn der Trocknung ist wieder ein drastischer Anstieg zu verzeichnen. Die Tatsache, dass dieser Abfall nur bei einigen bestimmten Aminosäuren auftritt, spricht nicht für einen Verlust durch Exsudation, sondern vielmehr eindeutig für kontrollierte Verstoffwechselung.

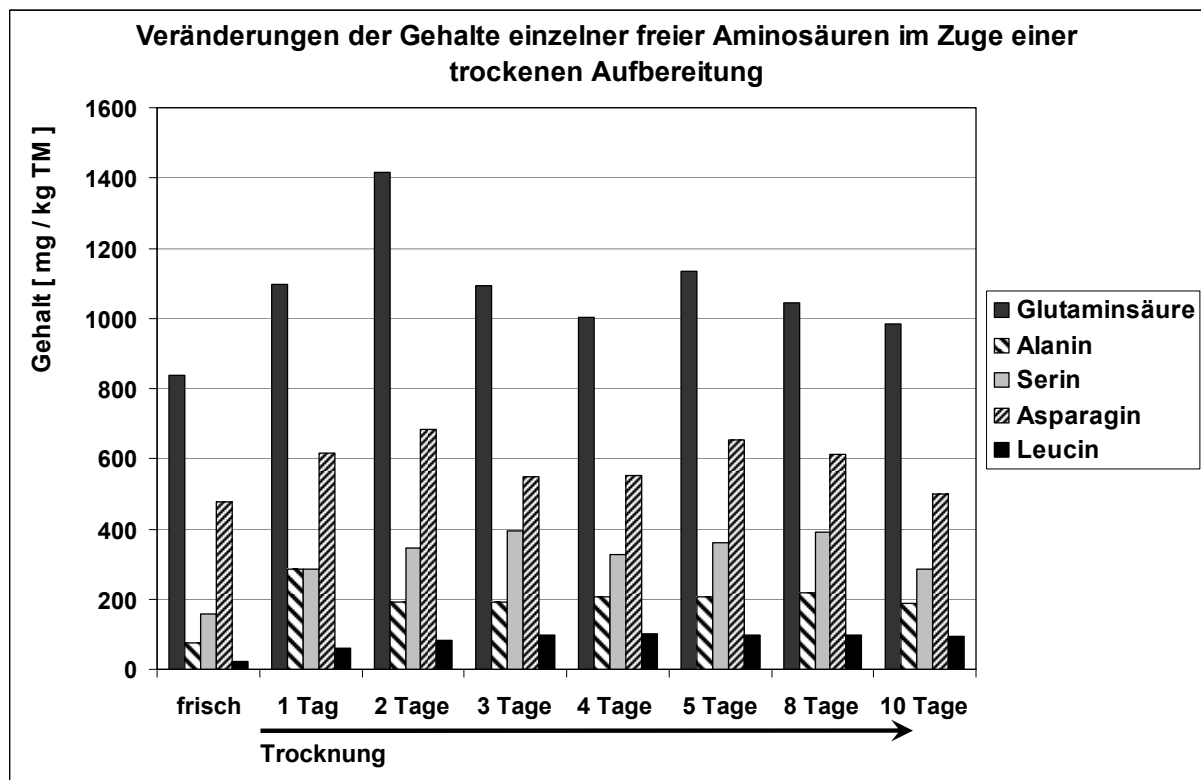


Abb. 47: Entwicklung der Gehalte von Glutaminsäure, Alanin, Serin, Asparagin und Leucin während trockener Laboraufbereitung in Arabica Kaffeesamen (*Coffea arabica* L.).

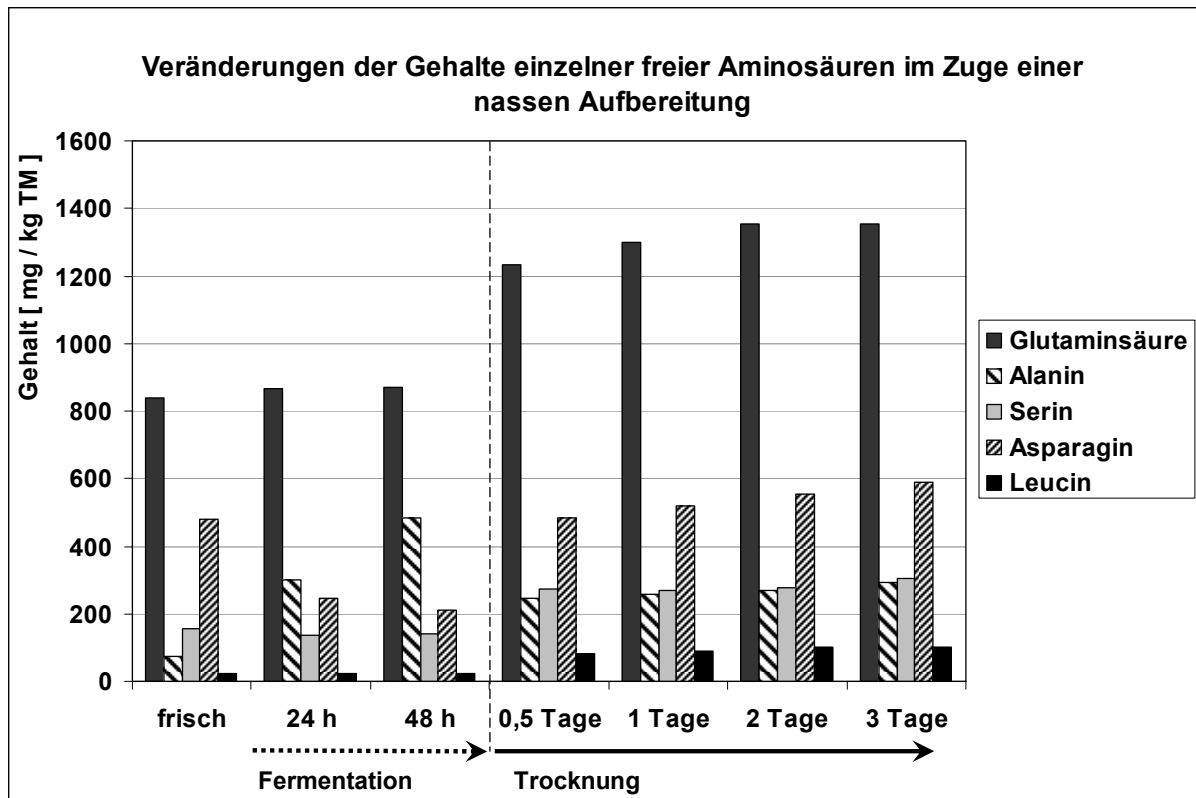


Abb. 48: Entwicklung der Gehalte von Glutaminsäure, Alanin, Serin, Asparagin und Leucin während trockener Laboraufbereitung in Arabica Kaffeesamen (*Coffea arabica* L.).

Darüber hinaus zeigt dieses Beispiel, dass bei den Gehalten der freien Aminosäuren nicht nur GABA aufbereitungsspezifischen Veränderungen unterworfen ist, sondern mindestens zwei weitere Aminosäuren davon betroffen sind, nämlich Asparagin und Serin. Wobei sich dies aber nicht in der Endzusammensetzung, sondern nur in Proben aus Zwischenstadien der Aufbereitung offenbart.

3.3.1.2 Aminosäuregehalte während der Lagerung von Rohkaffeebohnen

Um auch die Einflüsse einer Lagerung auf die Gehalte der freien Aminosäuren zu erfassen, wurden über einen Zeitraum von 24 Monaten in gelagerten Rohkaffeebohnen die Aminosäuregehalte bestimmt. Bei den meisten Aminosäuren konnten über die zwei Jahre der Lagerung keine signifikanten Veränderungen gefunden werden. Die Verläufe der Gesamtaminosäuregehalte (mit und ohne GABA, siehe Abb. 49) sowie die einiger ausgewählter Aminosäuren (Abb. 50 und Abb. 51) sind im Folgenden exemplarisch dargestellt:

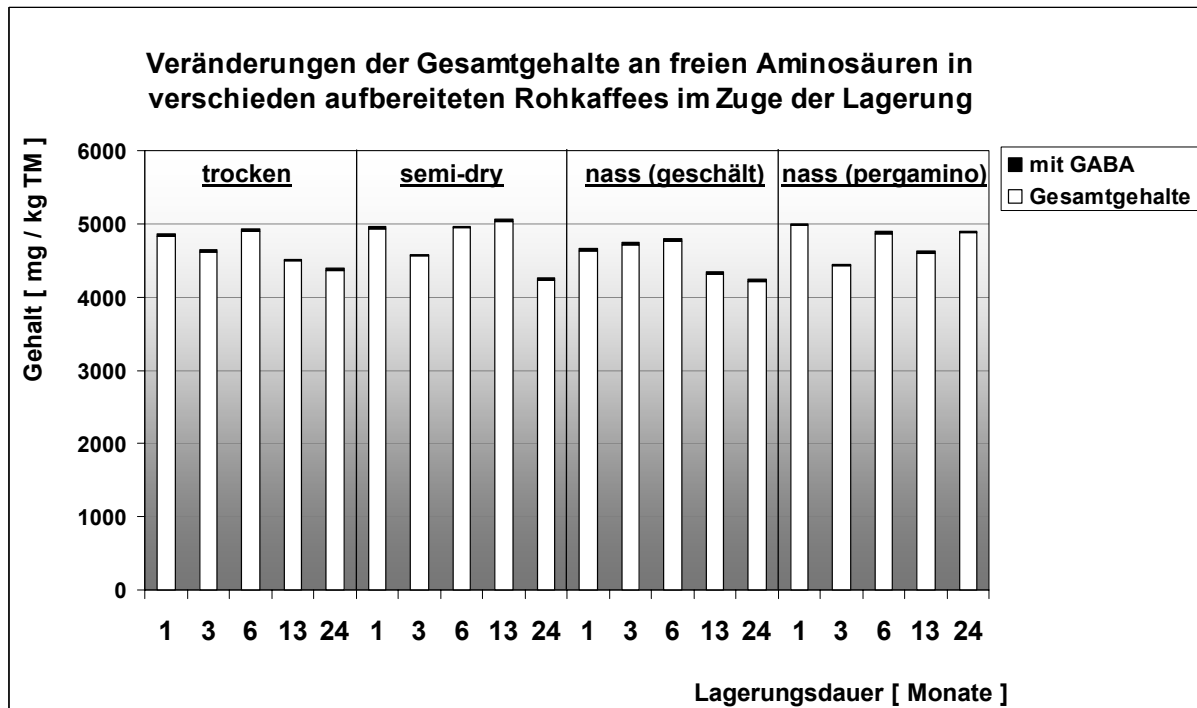


Abb. 49: Veränderung der Gesamtaminosäuregehalte während einer zweijährigen Lagerung von Rohkaffee in Abhängigkeit von der Aufbereitungsmethode mit und ohne Berücksichtigung der nicht proteinogenen Aminosäure GABA; zusätzlich wird unterschieden, ob der nass aufbereitete Kaffee geschält oder noch in der Hornschale gelagert wurde.

Aus Abb. 49 ist zu entnehmen, dass in den Proben aus den Feldversuchen, die für die Lagerung unter kontrollierten Bedingungen verwendet wurden, die trocken aufbereiteten Kaffees nicht durch hohe GABA-Gehalte gekennzeichnet waren. Dieser Befund stellt eine bemerkenswerte Ausnahme gegenüber früheren Ergebnissen [16] und auch gegenüber den in dieser Arbeit analysierten Laboraufbereitungen dar. Allerdings ist anzumerken, dass bereits TRAUTWEIN (1987) [36] einen Brasil-Kaffee mit niedrigen und einen Kolumbien-Kaffee mit hohen GABA-Gehalten nennt. Wenn auch TRAUTWEIN keine Angaben zur Aufbereitung der von ihr untersuchten kommerziellen Rohkaffeeproben machen konnte, so lässt sich doch aller Wahrscheinlichkeit nach sagen, dass es sich bei dem Brasil-Kaffee um einen ungewaschenen, trocken aufbereiteten und bei dem Kolumbien-Kaffee um einen gewaschenen, nass aufbereiteten Arabica-Kaffee handelte. Eine Erklärung für diese von den sonst gefundenen GABA-Gehalten abweichenden Werte wäre eine extrem rasche Trocknung im Falle des besagten Brasil-Kaffees und eine verlangsamte Trocknung des angesprochenen Kolumbien-Kaffees. Auch im Fall der für diese Arbeit hergestellten trocken aufbereiteten Lagerungsproben sollten die Ursachen für relativ niedrige GABA-Werte in den genauen Umständen der Trocknung zu suchen sein: Hierbei ist hervorzuheben, dass die Trocknung auf der Sonnenterasse (siehe Kapitel 2.2) während einer Wetterperiode mit reichlich Sonnenschein und geringer Luftfeuchtigkeit erfolgte. In der Konsequenz wurden auch bei der trockenen Aufbereitung vergleichsweise rasch die angestrebten Restfeuchtegehalte von 12 % erreicht. Möglicherweise war dadurch das Zeitfenster für eine ausgeprägte Stressantwort zu eng, wodurch nur wenig GABA akkumuliert wurde.

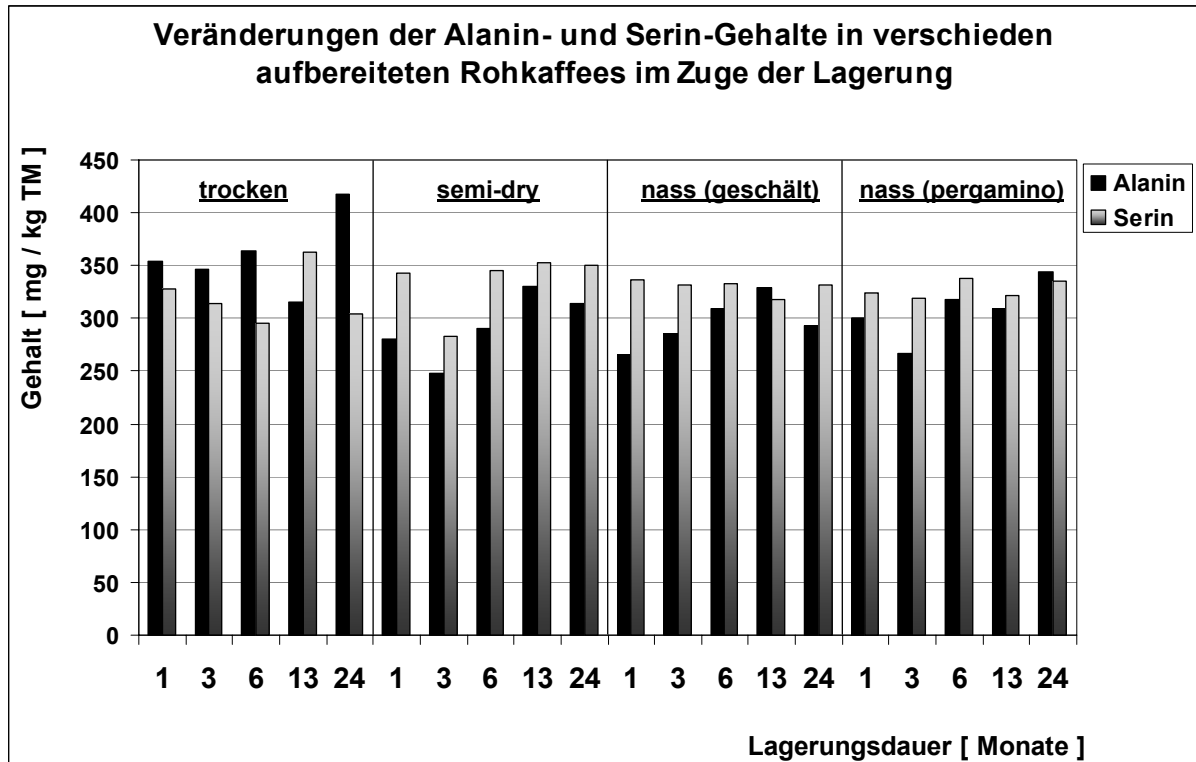


Abb. 50: Veränderung der Alanin- und Serin-Gehalte während einer zweijährigen Lagerung von Rohkaffee in Abhängigkeit von der Aufbereitungsmethode; zusätzlich wird unterschieden, ob der nass aufbereitete Kaffee geschält oder noch in der Hornschale gelagert wurde (pergamino).

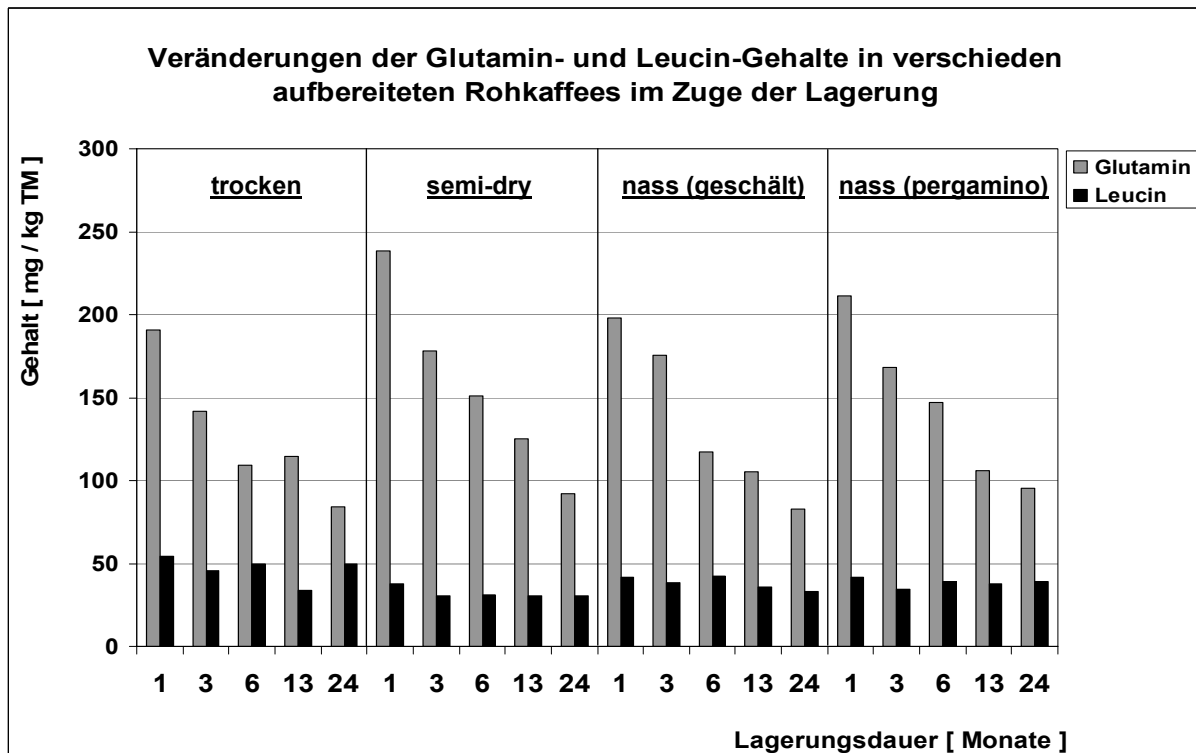


Abb. 51: Veränderung der Glutamin- und Leucin-Gehalte während einer zweijährigen Lagerung von Rohkaffee in Abhängigkeit von der Aufbereitungsmethode; zusätzlich wird unterschieden, ob der nass aufbereitete Kaffee geschält oder noch in der Hornschale gelagert wurde (pergamino).

Davon abgesehen ist festzuhalten, dass die GABA-Gehalte keinen signifikanten Schwankungen während der Lagerung unterliegen.

Die Analysen der weiteren Aminosäuren haben gezeigt, dass sich die Gehalte der meisten Aminosäuren während der Lagerung nicht signifikant ändern. Eine Ausnahme bildet Glutamin, das in der Konzentration während der Lagerung sukzessive abnimmt, und zwar unabhängig von der Aufbereitungsmethode und auch unabhängig davon, ob geschält oder ungeschält gelagert wurde (siehe Abb. 51).

3.3.2 Lösliche niedermolekulare Kohlenhydrate

Alternativ zu den Aminosäuren repräsentieren die Kohlenhydrate wichtige Aromavorstufen. Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob Änderungen in der Zusammensetzung der Kohlenhydrate auftreten und wenn ja, ob diese für einen Teil der Aromaveränderungen im Zuge der Lagerung verantwortlich sein können. Die entsprechenden Untersuchungen sind in diesem Kapitel dargestellt.

Auch die löslichen niedermolekularen Kohlenhydrate sind bereits öfter Gegenstand der Forschung gewesen. Allerdings wurde noch nie untersucht, ob die Aufbereitung einen Einfluss auf die Zusammensetzung und den Gehalt der niedermolekularen Kohlenhydrate in Arabica-Kaffee hat. Die einzigen Arbeiten hierzu beziehen sich auf Robusta-Kaffee [136]. Zwar wurden in der Vergangenheit Untersuchungen angestellt, wie sich eine ungünstige Lagerung (d.h. unter tropischen Bedingungen) auf die Zuckergehalte von Rohkaffee auswirkt [23]. Jedoch gibt es keine Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen einer längeren Lagerung unter Standardbedingungen auseinandersetzen.

Die in der Literatur zu findenden Angaben über die Gehalte der niedermolekularen Kohlenhydrate in Rohkaffees weisen große Variationen auf. Nach BRADBURY (2001) [31] enthält Arabica-Rohkaffee zwischen 5 % und 8,5 % TM Saccharose. Die Glucose-Gehalte liegen zwischen < 0,01 % und 0,45 %, bei Fructose liegen diese Gehalte zwischen 0,02 % und 0,40 %. Des Weiteren enthalten Arabicas freie Arabinose mit einem Gehalt zwischen < 0,01 % und 0,15 %. Das Vorkommen der Oligosaccharide Stachyose und Raffinose sowie der Monosaccharide Rhamnose und Mannose konnte bisher nicht immer bestätigt werden, wobei die Gehaltsangaben von Rhamnose nie mehr als 0,02 % und die von Mannose nie mehr als 0,1 % der Trockenmasse ausmachten.

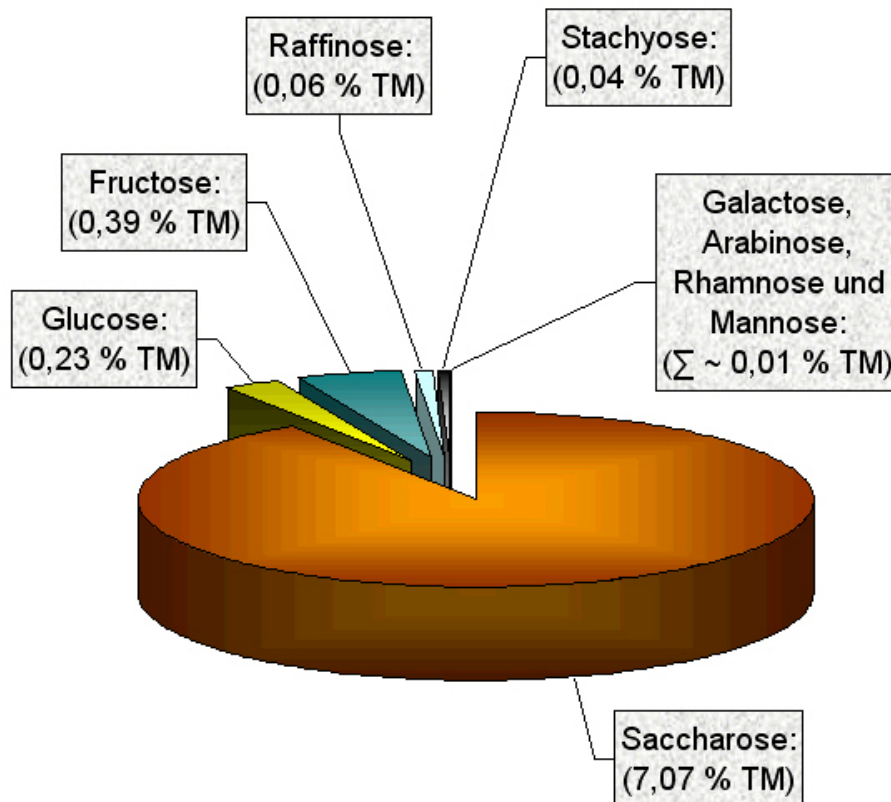


Abb. 52: Typische Verteilung der Zucker eines trocken aufbereiteten Arabica Rohkaffees aus Brasilien (*Coffea arabica* Var. *Acaiá*).

Die typische Verteilung der Zucker in einem trocken aufbereiteten Rohkaffee wird in Abb. 52 dargestellt. In der betrachteten brasilianischen Probe (*Coffea arabica* L.) der Varietät *Acaiá* macht die Summe der niedermolekularen Kohlenhydrate etwa 8 % der Trockenmasse aus. Den bei weitem größten Teil nimmt davon die Saccharose mit etwa 7 % ein, gefolgt von den NebenkompONENTEN Glucose, Fructose, Raffinose und Stachyose sowie den MinorkompONENTEN Galactose, Arabinose, Rhamnose und Mannose (siehe Abb. 52).

Wie bereits in den vorherigen Kapiteln dargestellt, unterliegen die Kaffeesamen während der Aufbereitung und Lagerung einem beträchtlichen Stoffwechsel. Entsprechend ist zu vermuten, dass die Situation, wie in Abb. 52 gezeigt, das Produkt entsprechender Aktivität ist. Der Kaffeesame besteht zu etwa 50 % aus Polysacchariden [137], darunter Cellulose, aber vor allem Mannane, Galacto (-mannane) und in geringeren Mengen Arabinogalactane. Des Weiteren enthalten die Samen Oligosaccharide, die als frühe Kohlenhydratreserve in anderen Samen bekannt sind (z.B. in Soja [138] und Carob [128]).

Um den Einfluss der Aufbereitung untersuchen zu können, müssen auch hier andere Einflussgrößen (z.B. Reifeunterschiede) ausgeschlossen werden. Daher muss homogenes Ausgangsmaterial gleicher Herkunft für beide Aufbereitungen eingesetzt werden.

Wie eingangs erwähnt, unterliegen insbesondere die Gehalte von Saccharose in verschiedenen Rohkaffees hohen Schwankungen, für die bisher keine plausiblen

Erklärungen gefunden werden konnten. Eine bereits in der Literatur diskutierte Möglichkeit wären enzymatische Hydrolysen [23, 31, 62]. Eindeutige Hinweise darauf konnten jedoch nur bei Lagerung in sehr feuchter Umgebung festgestellt werden (80 % rel. Luftfeuchte) [23]. Auch ist unbekannt, wo die wiederholt beschriebenen Diskrepanzen im Gehalt der anderen Zucker, wie Stachyose und Raffinose oder Glucose und Fructose, herrühren [31, 62].

Unklar ist bisher auch, ob die beobachteten Schwankungen in den Zuckergehalten bereits im reifen frischen Samen auftreten oder erst nach der Aufbereitung. Daher kommt der Saccharose im Folgenden eine besondere Aufmerksamkeit zu. Bei den weiteren in dieser Arbeit untersuchten löslichen Kohlenhydraten handelt es sich um die Oligosaccharide Stachyose und Raffinose und die Monosaccharide Glucose, Fructose, Galactose, Rhamnose und Mannose sowie die Arabinose.

Freie Mannose, wird in mehreren Arbeiten als Bestandteil der Fraktion niedermolekularer Kohlenhydrate des Rohkaffees angeführt [39, 52, 55, 58, 59]. Mannose ist auch das wesentliche Hydrolyseprodukt der Mannane, daher folgerte BRADBURY (2001) [31], dass ein Abbau des Mannans an einer Erhöhung des Mannose-Gehaltes in den Kaffeesamen abzulesen sein müsse. Jedoch ist aus Untersuchungen an anderen Samen bekannt, dass freie Mannose auch während der Mobilisierung des Mannans niemals in nennenswerten Mengen akkumuliert wird [139, 140]. Stattdessen wird sie über die Umwandlung zu Glucose und Glucosephosphaten umgehend in den allgemeinen Zuckerstoffwechsel eingespeist. Im Stoffwechsel der lebendigen Zelle ist eine derartige Metabolisierung der Mannose unabdingbar, da erhöhte Mannose-Konzentrationen auf die Zelle toxisch wirken [141, 142].

Exogen applizierte Mannose wird im pflanzlichen Stoffwechsel über eine Hexokinase zu Mannose-6-Phosphat konvertiert. Allerdings wird Mannose-6-Phosphat nicht weiter verstoffwechselt, da dem pflanzlichen Stoffwechsel eine Mannose-6-Phosphat-Isomerase fehlt, welche für deren Umsetzung zu Fructose-6-Phosphat nötig wäre [143]. Die hohe Akkumulation von Mannose-6-Phosphat hemmt die Phosphoglucose-Isomerase und blockiert so die Glykolyse. Darüber hinaus hemmt die irreversible Bildung von Mannose-6-Phosphat durch das Aufbrauchen des Orthophosphats, das für die ATP-Bildung benötigt wird, die Zellatmung. Zusätzlich zu diesen metabolischen Effekten unterdrückt Mannose die Transkription von Genen, die in der Photosynthese und dem Glyoxylatzyklus gebraucht werden [144, 145].

Das Beispiel der Mannose zeigt, dass der Stoffwechsel der niedermolekularen Kohlenhydrate insgesamt berücksichtigt werden muss. So könnte eine Freisetzung von Mannose aus dem Speichermannan mittelbar eine Erhöhung der Glucose bewirken, welche wiederum in Fructose oder weitere Zucker umgewandelt werden könnte.

3.3.2.1 Zuckergehalte im Verlauf der Aufbereitungen

Um die Veränderungen durch die Aufbereitung zu erfassen, werden die Gehalte der Rohkaffee-Bohnen nach den verschiedenen Aufbereitungen denen von frischen Bohnen derselben Charge gegenübergestellt. Diese Proben entstammen Laboraufbereitungen frischer Kirschen, die aus Mexiko und Tansania per Luftfracht bezogen wurden (siehe Kapitel 2.2.1.1). Die Reihenfolge der Zucker in der folgenden Betrachtung der Ergebnisse richtet sich nach ihrem mengenmäßigen Vorkommen im Kaffeesamen.

a) Saccharose

Der mengenmäßig bei weitem bedeutendste Zucker im Rohkaffeesamen ist mit 5 - 8,5 % TM die Saccharose (siehe Abb. 53). Der Saccharose-Gehalt ändert sich jedoch weder im Zuge der Aufbereitungen der Kirschen aus Tansania noch im Zuge der Aufbereitungen der zweiten Charge aus Mexiko wesentlich.

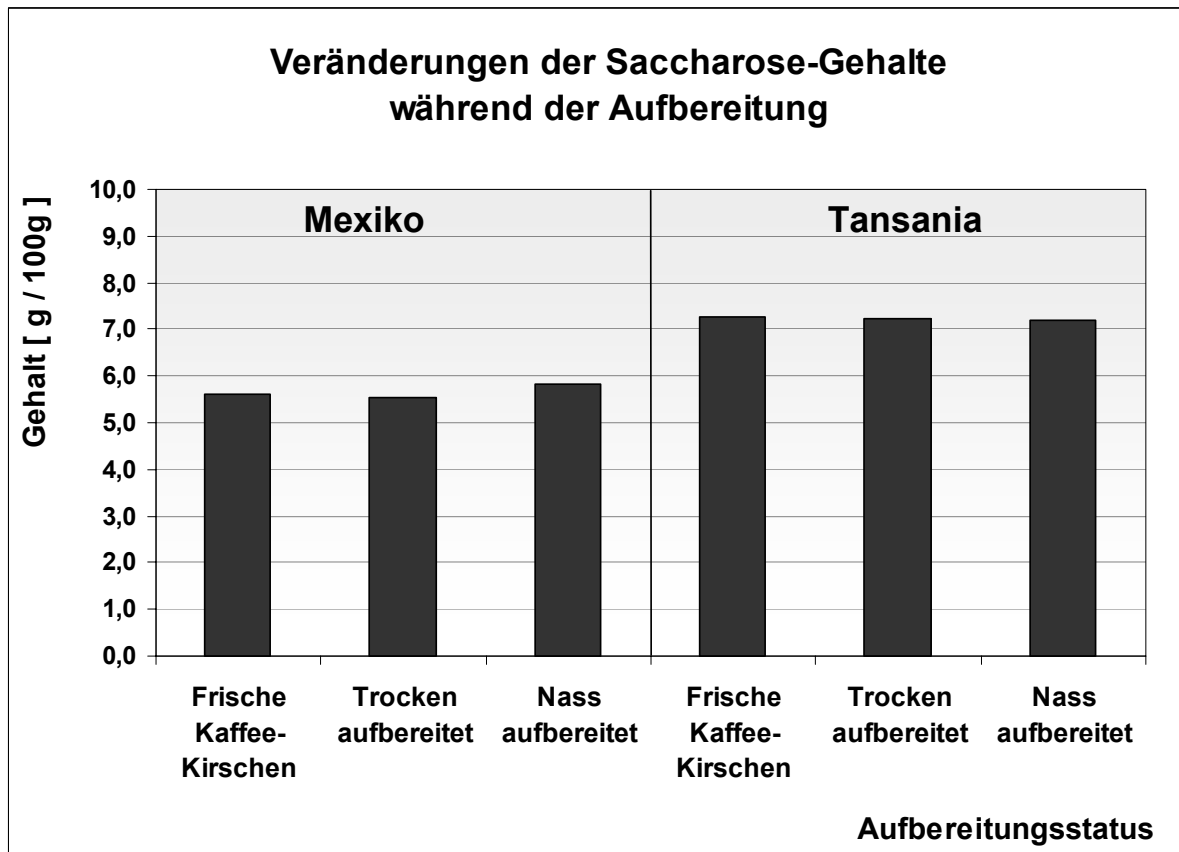


Abb. 53: Saccharose-Gehalte von zwei Rohkaffees unterschiedlicher Herkunft jeweils vor und nach den unterschiedlichen Laboraufbereitungen.

Damit wird die Sichtweise von BUCHELI (1996) [23] bestätigt, wonach die Aufbereitung keinerlei Einflüsse auf die Saccharose-Konzentration ausübt. Auffällig ist wiederum der starke Unterschied in der Saccharose-Konzentration zwischen den beiden Arabica-Kaffees aus Afrika und Mittelamerika. Hier treten ganz offensichtlich Provenienz-Unterschiede zu Tage, die auch in den Ergebnissen der später dargestellten Analysen zu kommerziellen Rohkaffeeproben bestätigt werden (siehe

Tab. 13). Nach neueren Untersuchungen können sogar innerhalb einer einzelnen Provenienz entsprechende Unterschiede beobachtet werden, wobei hierfür Faktoren wie Hangexposition und Anbauhöhe verantwortlich sind [146]. Weitere Faktoren, die den Saccharose-Gehalt beeinflussen, sind: Genotyp, Größe und Form der Bohnen, Sonneneinstrahlung bzw. Beschattung, Wasserverfügbarkeit etc. [110, 146, 147].

b) Glucose und Fructose

Bei den Analysen der Glucose- und Fructose-Gehalte werden ganz wesentliche Unterschiede in den Gehalten der Zucker nach den unterschiedlichen Aufbereitungen (siehe Abb. 54) deutlich. Sowohl bei der Aufbereitung der mexikanischen Kaffeebohnen wie auch bei der des tansanischen Kaffees zeigt sich, dass der Gehalt an Glucose und Fructose in den Bohnen während der nassen Aufbereitung so stark abnimmt, dass im resultierenden Rohkaffee nur etwa ein Zehntel dessen vorhanden ist, was im trocken aufbereiteten zu finden ist. Anzumerken ist hierbei, dass die Glucose in den beiden Aufbereitungen ein leicht unterschiedliches Verhalten zeigt. So bleibt der Gehalt an Glucose während der trockenen Aufbereitung im mexikanischen Kaffee in etwa konstant, wohingegen sich der Glucose-Gehalt bei der tansanischen Variante sogar noch erhöht. Die extreme Abnahme an Glucose und Fructose auf weniger als 10 % des Gehaltes der jeweiligen frischen Bohnen während der nassen Aufbereitung ist jedoch beiden gemein.

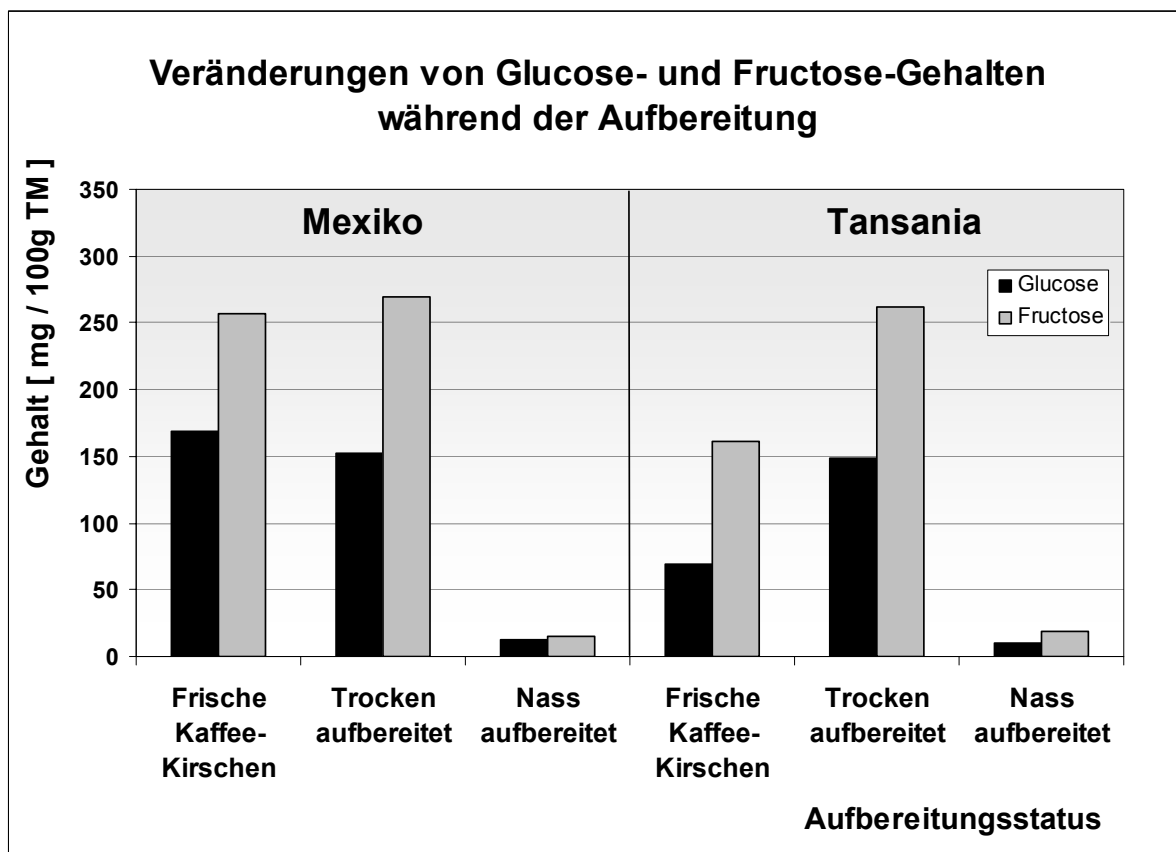


Abb. 54: Gehalte von Glucose und Fructose in zwei Arabica-Rohkaffees jeweils vor und nach trockener bzw. nasser (Labor-) Aufbereitung.

Für diese Unterschiede gibt es verschiedene Erklärungen: So könnten die lebenden Kaffeesamen diese Stoffe als schnelle Energiereserve benutzen und veratmen. Die nasse Aufbereitung könnte durch die Entfernung der Pulpa für einen schnellen Anschlag des Stoffwechsels in Richtung Keimungsstoffwechsel sorgen und damit zu verstärkter Atmung führen. Allerdings ist auch bei Samen, die einer trockenen Aufbereitung unterworfen werden, ein respirativer Stoffwechsel zu erwarten. Die in Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 dargestellten Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass auch bei der trockenen Aufbereitung Keimungsstoffwechsel induziert wird. Es muss zudem aufgrund der langsameren Trocknung vermutet werden, dass ein wesentlich längerer Zeitraum für derartige Prozesse zu Verfügung steht. Somit würde Respiration (und zwar in beiden Fällen der Aufbereitung) keine ausreichende Begründung für den ungleichen Verbrauch der beiden Hexosen darstellen.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit liefert die Tatsache, dass sich die Bohnen während der nassen Aufbereitung 16 bis 24 h in einem sauerstoffarmen Milieu befinden und daher Hypoxie erleiden [7, 148]. Es ist bekannt, dass keimende Samen zur Deckung ihres Energiebedarfs von Respiration auf alkoholische oder Milchsäuregärung umschalten können [149]. Dabei ist zu beachten, dass die Energieeffizienz der Gärung deutlich geringer ist als die der Atmung. Für die gleiche Menge an benötigter Energie in Form von ATP setzen gärende Samen also viel mehr Glucose (und Fructose) um als atmende Samen. Damit wäre eine deutliche Abnahme dieser Hexosen im nass aufbereiteten Samen einleuchtend erklärt. Trocken aufbereitete Samen sind während der gesamten Aufbereitung gut mit Sauerstoff versorgt und müssen folglich nicht von Atmung auf Gärung umschalten.

Des Weiteren könnte eine oft in der Literatur beschriebene Auswaschung von Stoffen (einschließlich Zuckern) aus dem Samen und ein damit verbundener Trockenmasseverlust [90, 150] während der Kaffeefermentation für die gefundenen Unterschiede verantwortlich sein. Tatsächlich kann diese Möglichkeit nicht völlig ausgeschlossen werden, auch wenn die Auswaschung niedermolekularer Substanzen eher typisch für trockene Samen ist, die einer Quellung unterworfen sind [151]. Ursache hierfür sind vorübergehende und zum Teil irreversible Schädigungen von Membranen [151]. Während der Kaffeefermentation ist die Situation allerdings völlig anders. Die Samen sind nicht getrocknet, sondern haben einen Feuchtegehalt von etwa 50 % und es besteht kein Grund anzunehmen, dass die Kaffeesamen derartige Schäden aufweisen.

In der Literatur sind derartigen Daten nicht bekannt, lediglich GUYOT *et al.* (1995) berichten von einer Korrelation zwischen der Aufbereitungsmethode und dem Fructose-Gehalt [70], wobei allerdings Robusta-Kaffees untersucht worden waren. Anders als bei den hier vorliegenden Daten für Arabica-Kaffee wurden erhöhte Fructose-Gehalte von den Autoren mit nasser statt mit trockener Aufbereitung der Robusta-Kaffees korreliert. Die von den Autoren genannten Unterschiede im

Fructose-Gehalt waren allerdings wesentlich geringer: 260 - 270 mg/100 g bei nass aufbereitetem Robusta gegenüber 150 - 190 mg/100 g bei trocken aufbereitetem.

c) Raffinose und Stachyose

Es ist jedoch festzustellen, dass beide Oligosaccharide in beträchtlichen Konzentrationen im Kaffee vorkommen. Ihre Gehalte unterliegen auch innerhalb einer Charge vergleichsweise hohen Schwankungen.

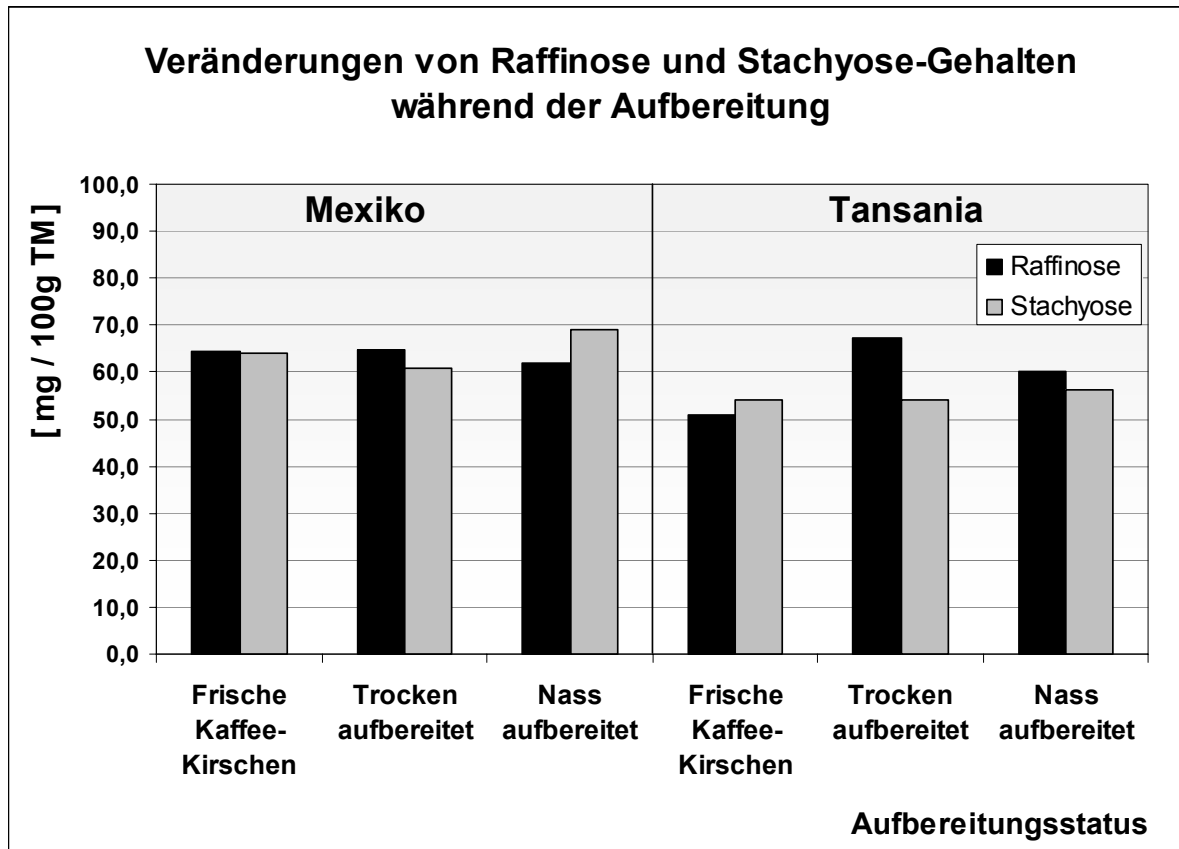


Abb. 55: Gehalte von Raffinose und Stachyose in zwei Arabica-Rohkaffees jeweils vor und nach trockener und nasser (Labor-) Aufbereitung.

Allerdings sind diese Schwankungen nicht mit einer der beiden Methoden der Aufbereitung in Beziehung zu setzen. So sinkt der Gehalt an Raffinose während der Fermentation der mexikanischen Proben ab, während er im Zuge der Fermentation der tansanischen Proben leicht ansteigt. Allgemein zeigen sich die Gehalte der beiden Zucker durch die Aufbereitungen kaum beeinflusst (siehe Abb. 55). Es wäre möglich, dass die Wasserstressreaktion im Kaffeesamen während beider Nacherntebehandlungen eine Mobilisation der Oligosaccharide verhindert. Eine solche Situation wurde für *Ceratonia silqua* L. (Carob) Samen beschrieben, die während der Keimung einem Trockenstress ausgesetzt waren [152].

d) Galactose

Auch bei der Galactose ist ein Einfluss der Aufbereitung auf den Gehalt dieses freien Zuckers in den Bohnen offensichtlich (siehe Abb. 56). Allerdings ist im Gegensatz zu Glucose und Fructose kein Unterschied zwischen nass und trocken aufbereiteten Bohnen zu erkennen. Der Gehalt an Galactose nimmt im Laufe der nassen Aufbereitung - ähnlich dem der Glucose und Fructose (hier jedoch nicht ganz so stark ausgeprägt) - auf etwa ein Drittel ab. Bemerkenswert ist aber, dass er analog dazu auch während der trockenen Aufbereitung abnimmt. Dies spricht eindeutig dagegen, dass die beobachteten Verluste auf eine Auswaschung zurückzuführen sind.

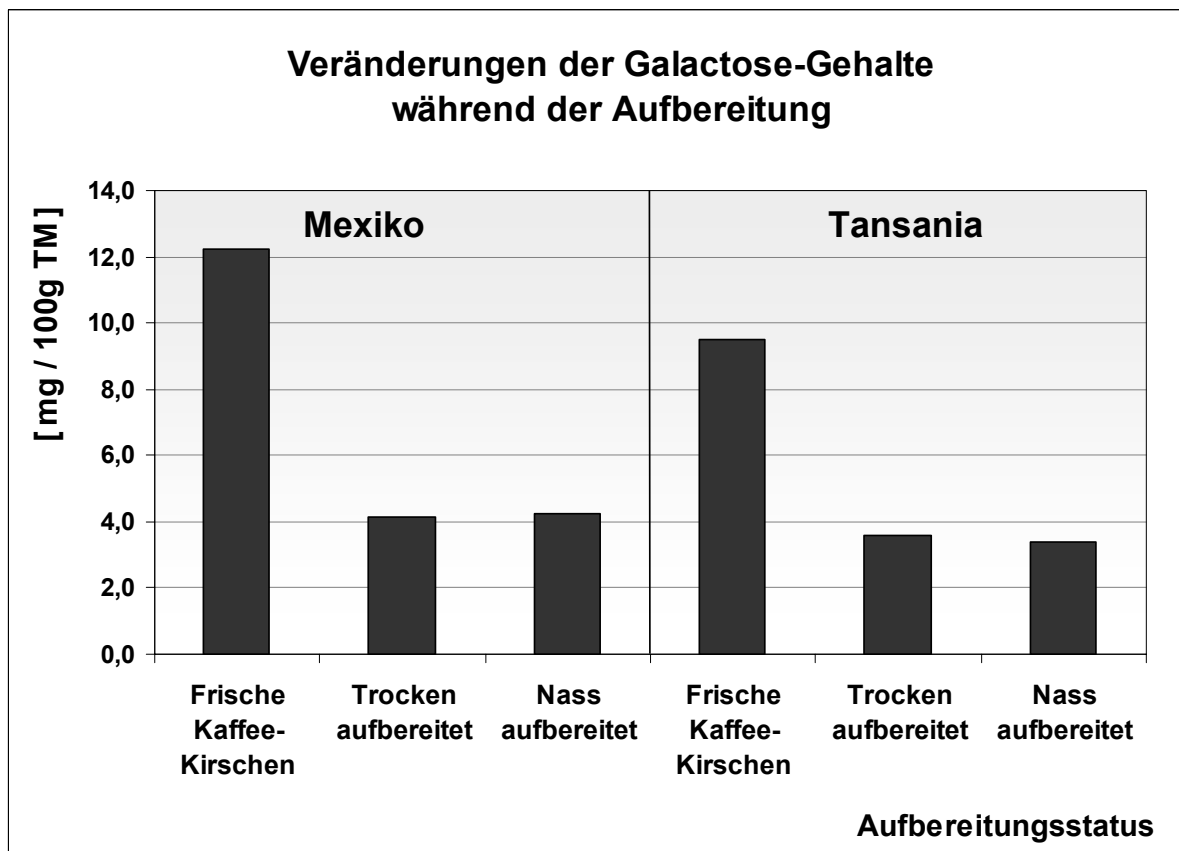


Abb. 56: Gehalte von Galactose in zwei Arabica-Rohkaffees jeweils vor und nach trockener und nasser (Labor-) Aufbereitung.

Es ist zu vermuten, dass Galactose in den Atmungs- oder Gärungsstoffwechsel der Kaffeesamen einfließt und entsprechend verbraucht wird. Möglicherweise ist die Trockenstress-Situation der Kaffeesamen verantwortlich dafür, dass trotz gleichzeitig vorhandener α -Galactosidase-Aktivität im Samen keine weitere Galactose freigesetzt wird, wie es SPYROPOULUS (1980) bei Versuchen an Carobsamen beschreibt [152]. Offenbar ist die Freisetzung von Galactose in den lebenden Samen einer strengen Kontrolle (beispielsweise auf räumlicher Ebene) unterworfen.

e) Rhamnose und Arabinose

Die Gehalte von Rhamnose sind allgemein sehr gering (siehe Abb. 57). Ihre Konzentration ist etwa um den Faktor 50 bis 100 geringer als Glucose und Fructose. Die Gehalte von freier Rhamnose verändern sich in Kaffeesamen durch die Aufbereitung nicht. Im Vergleich dazu sind die Gehalte an Arabinose um eine Größenordnung höher. Anders als die Rhamnose-Gehalte gehen die der Arabinose im Zuge beider Aufbereitungen zurück, wobei der Rückgang im Zuge der nassen stärker ist als derjenige während der trockenen Aufbereitung. Der hier analog zur Galactose zu beobachtende Rückgang der Zuckergehalte im Zuge beider Aufbereitungen spricht wiederum gegen eine Exsudation als Ursache für die Verluste. Bisher ist nicht geklärt, ob Arabinogalactane in Pflanzensamen ausschließlich strukturelle Funktionen erfüllen, oder auch als Reservestoff dem Samen dienen können [140]. Prinzipiell kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Arabinylreste abgespalten werden und freie Arabinose in den Stoffwechsel der Pflanze einfließt.

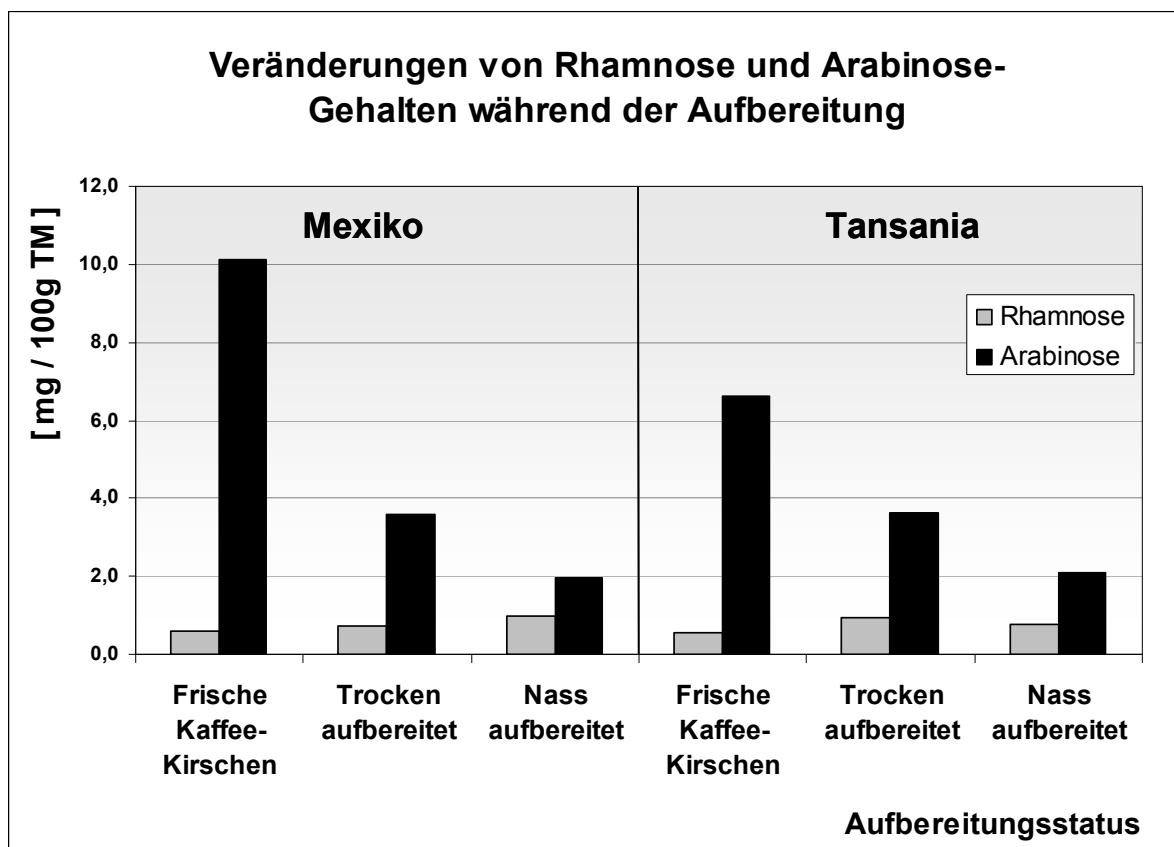


Abb. 57: Gehalte von Rhamnose und Arabinose in zwei Arabica-Rohkaffees jeweils vor und nach trockener und nasser (Labor-) Aufbereitung.

Die Gehalte der Pentose Arabinose könnten nach TRESSL (1998) besonders wichtig für die Aromabildung sein [153]. Als reduzierende Aldopentose kann sie demnach ebenfalls als Vorläuferin von *Maillard*-Reaktionen angenommen werden und somit für die Aromaentstehung während des Röstens mitverantwortlich sein.

f) Mannose

Bei der Analyse der Mannose-Gehalte zeigt sich, dass auch in diesem Fall die Aufbereitung einen Effekt auf den Gehalt dieses Zuckers im resultierenden Rohkaffee hat (siehe Abb. 58). Und zwar ist sowohl bei der trockenen als auch bei der nassen Aufbereitung ein Absinken der Gehalte zu beobachten. Dieses Absinken ist aber bei der trockenen Aufbereitung geringer ausgeprägt als bei der nassen Aufbereitung. Besonders deutlich ist der Rückgang der Mannose-Gehalte in der Tansaniaprobe, wo nach nasser Aufbereitung nur noch Spuren von Mannose nachweisbar waren.

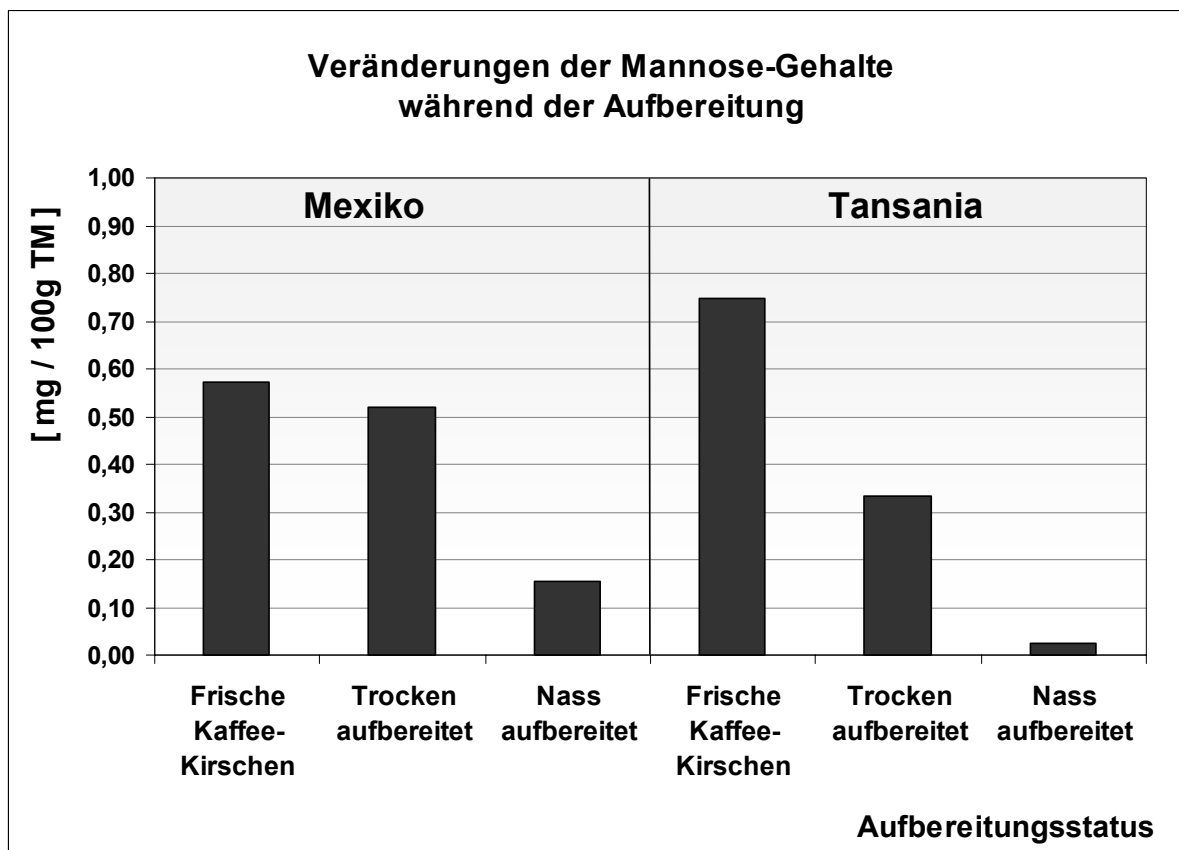


Abb. 58: Gehalte von Mannose in zwei Arabica-Rohkaffees jeweils vor und nach trockener und nasser (Labor-) Aufbereitung.

Entgegen der Vermutung von BRADBURY (2001) [31] hat die Nacherntebehandlung demnach eher einen minimierenden Effekt auf die Mannose-Gehalte in Rohkaffees. Die physiologischen Zusammenhänge sind bereits zu Beginn dieses Kapitels dargelegt worden.

g) Vergleich mit anderen Rohkaffees

Um die gefundenen Zusammenhänge zwischen vergleichsweise hohen und vergleichsweise niedrigen Glucose- und Fructose-Gehalten und der Art der Nacherntebehandlung zu verifizieren, wurden weitere verschieden aufbereitete Rohkaffees (15 Arabica-Kaffees und vier Robusta-Kaffees) auf ihren Zuckergehalt hin untersucht (siehe Tab. 13). Da es sich bei diesen Rohkaffees um Handelsware handelte, war ein Vergleich mit den frischen, unbehandelten Kaffeesamen nicht möglich. Ebenso war keine Vergleichsmöglichkeit mit parallel aufbereiteten Proben der jeweils anderen Aufbereitungsmethode gegeben.

Tab. 13: Ergebnisse der Zuckergehaltsanalysen von verschiedenen kommerziellen Rohkaffeeproben

Art / Aufbereitungsmethode	Provenienz/ Probe	Zuckergehalt in % TM		
		Saccharose	Fructose	Glucose
Arabica / trocken	Äthiopien 1	8,255	0,165	0,044
	Brasilien 1	9,252	0,140	0,043
	Brasilien 2	8,703	0,154	0,042
Arabica / nass	Äthiopien 2	6,301	0,008	0,005
	Brasilien 3	7,605	0,015	0,006
	Mexiko	9,643	0,052	0,032
	Honduras	6,923	0,050	0,028
	Kenia	9,308	0,058	0,028
	Peru	8,209	0,050	0,022
	El Salvador	9,890	0,047	0,021
	Kamerun	5,870	0,036	0,013
	Guatemala	8,514	0,085	0,045
	Kolumbien 1	8,763	0,059	0,042
	Kolumbien 2	8,069	0,009	0,005
	Kolumbien 3	7,155	0,195	0,005
Robusta / trocken	Indonesien	4,846	0,183	0,057
	Elfenbeinküste	3,267	0,182	0,027
	Uganda	4,554	0,108	0,030
	Vietnam	3,149	0,157	0,096

Die Analysen der kommerziellen Rohkaffees bestätigen weitgehend die Analysen der definierten Proben aus Feldversuchen und Laboraufbereitungen. Die Saccharose-Gehalte von Arabicas sind, wie in der Literatur beschrieben [31], im Vergleich zu Robusta-Rohkaffees grundsätzlich höher. Darüber hinaus bestätigen die Arabica-Daten die von BUCHELI *et al.* (1996) [23] vertretene Ansicht, dass bei Arabica die Saccharose-Gehalte unabhängig von der Art der Aufbereitung sind. Gleichzeitig stehen sie jedoch im Gegensatz zu den Befunden von GUYOT *et al.* (1995) [70] für Robusta-Kaffees, die auf einen Zusammenhang von Aufbereitungsform und Saccharose-Gehalt hinweisen. Da jedoch ausschließlich trocken aufbereitete Robusta-Rohkaffees untersucht worden sind, können die diesbezüglichen Thesen von GUYOT (1995) [70] nicht grundsätzlich in Frage gestellt werden.

Vor allem aber wird durch die Analysen der kommerziellen Rohkaffees deutlich, dass die nass aufbereiteten Arabicas grundsätzlich bedeutend weniger Glucose als die trocken aufbereiteten enthalten. Allerdings sind zwei Ausnahmen zu nennen: *Guatemala und Kolumbien* 1. Noch eindeutiger fallen die Beziehungen zwischen Fructose-Gehalten und Aufbereitungsart ins Auge. Hier liegen die Gehalte in den trocken aufbereiteten Kaffees immer über 100 mg/100 g, während bei den einer nassen Aufbereitung entstammenden Proben die Gehalte deutlich unter 100 mg/100 g (bis hin zu lediglich 8 mg/100 g) angesiedelt sind. Hier bildet *Kolumbien* 3 eine Ausnahme⁸.

Des Weiteren muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den hier untersuchten kommerziellen Rohkaffees um Proben handelt, die eine unbestimmte Zeit gelagert worden sind. Wenn bereits in dem kurzen Abschnitt der Aufbereitung deutliche Veränderungen in den Gehalten der analysierten Zucker auftreten, so muss auch mit weiteren Veränderungen während der meist monatelangen Lagerung gerechnet werden. Genauere Untersuchungen hierzu liegen bisher nicht vor, deshalb soll im nächsten Kapitel dieser Frage nachgegangen werden.

3.3.2.2 Zuckergehalte während der Lagerung von Rohkaffees

Da wie in Kapitel 3.2.2 dargestellt, während der gesamten Lagerungsdauer noch aktive Enzyme vorliegen, könnten Speicherkohlenhydrate während der Lagerung über Hydrolysereaktionen abgebaut werden. Es ist davon auszugehen, dass die Geschwindigkeit dieser Reaktionen in erster Linie vom Wassergehalt der Samen abhängt. Darüber hinaus sollten in lebenden Samen gewisse Kontrollmechanismen greifen, die einen unregelmäßigen Abbau von Kohlenhydraten verhindern. Ein Beispiel hierfür ist möglicherweise die α -Galactosidase, die zwar sowohl in frischen Samen als auch in Rohkaffee ein vergleichsweise hohes Maß an Aktivität aufweist. Dennoch konnte kein sichtbarer Anstieg von freier Galactose während der Aufbereitung festgestellt werden. Im Verlauf der Lagerung verlieren die Kaffeesamen ihre Vitalität. Dessen ungeachtet lassen sich auch in abgestorbenen Samen beträchtliche hydrolytische Enzymaktivität nachweisen. Anders als im lebendigen Samen sind im abgestorbenen Samen keine aktiven Regulationsmechanismen mehr vorhanden. Eine postmortale (Teil-) Hydrolyse der (Galacto)-Mannane muss damit zwangsläufig zur Akkumulation von Oligo- und

⁸ In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass bei diesen Proben naturgemäß der jeweilige Aufbereitungsprozess nicht im Detail bekannt ist. Aus Untersuchungen zum GABA-Gehalt ist bekannt, dass bereits geringe Abweichungen von der Prozessführung bei der Aufbereitung - wie zu langsame oder schnelle Trocknung - einen starken Einfluss auf den GABA-Gehalt haben. Daher ist nicht auszuschließen, dass Veränderungen in der Prozessführung oder Witterungseinflüsse ebenfalls entsprechende Auswirkungen auf die Gehalte dieser Zucker haben können und es bei diesen Proben zu solchen Abweichungen während des Aufbereitungsprozesses gekommen ist.

Monosacchariden führen, denn im Gegensatz zum Kohlenhydratmetabolismus lebender Zellen können derartige Hydrolyseprodukte nicht weiter kontrolliert verstoffwechselt werden. Ob diese Zucker in weitere unkontrollierte, postmortale Reaktionen einfließen, ist nicht bekannt. Es ist denkbar, dass ein Teil dieser gebildeten Zucker im Zuge von Bräunungsreaktionen, wie sie von POKORNY (1975) [27] beschrieben wurden, verbraucht werden.

Es wurden über einen Zeitraum von 24 Monaten die Veränderungen der Zuckergehalte von Rohkaffees während der Lagerung untersucht. Bei den Proben handelte es sich um definiert aufbereitete Brasil-Kaffees (*Coffea arabica* L.), die im Sommer 2002 in Alfenas, Minas Gerais, Brasilien in Feldversuchen hergestellt worden sind. Ein Nebenaspekt der im Folgenden vorgestellten Untersuchungen soll sich mit der Frage beschäftigen, ob die aufbereitungsspezifischen Auswirkungen auf die Zusammensetzung der niedermolekularen Zucker während der Lagerung erhalten bleiben oder einer lagerungsbedingten weiteren Veränderung unterworfen sind. Daher sollen zunächst diejenigen Zucker betrachtet werden, bei denen die aufbereitungsspezifischen Unterschiede am stärksten zu Tage treten.

a) Glucose

Bei der Bestimmung der Glucose-Gehalte ist deutlich zu erkennen, dass auch bei den in Feldversuchen hergestellten Rohkaffeeproben aufbereitungsspezifische Unterschiede auftreten: trocken aufbereitete Rohkaffees weisen zunächst vergleichsweise hohe Glucose-Konzentrationen auf und nass aufbereitete drastisch niedrigere.

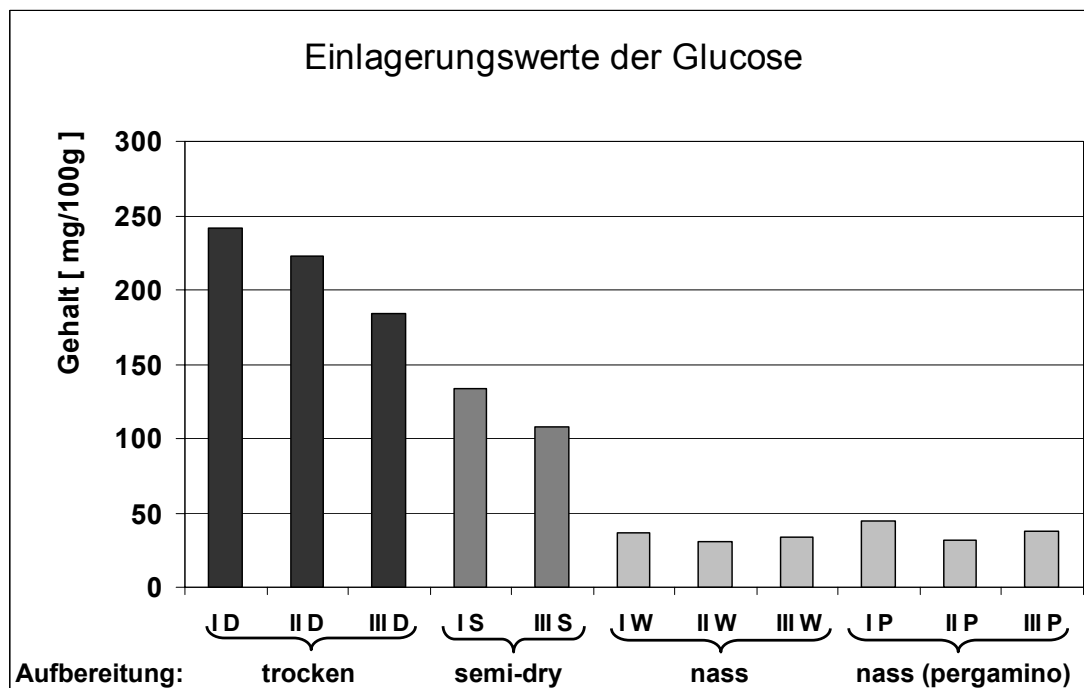


Abb. 59: Darstellung der Glucose-Gehalte in den verschiedenen aufbereiteten Rohkaffees aus den brasilianischen Feldversuchen, zum Zeitpunkt, als sie in Braunschweig eingelagert wurden (I Monatswerte).

Interessant ist dabei, dass Rohkaffees, die mit der quasi intermediär zwischen nasser und trockener Aufbereitung anzusetzenden semi-dry Methode aufgearbeitet wurden, und die nach ILLY (1995) [9] in der Tasse generell intermediäre Flavour-Charakteristiken aufweisen, in der vorliegenden Analyse gleichfalls intermediäre Glucose-Konzentrationen zu verzeichnen haben.

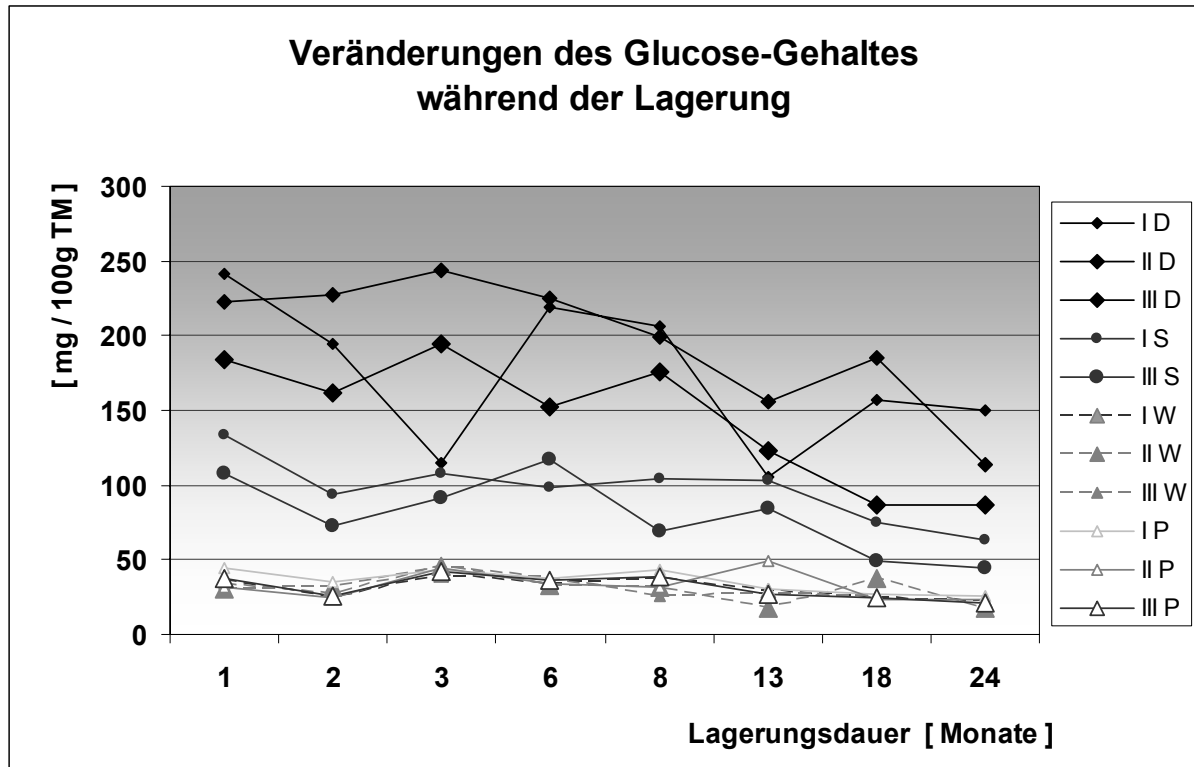


Abb. 60: Veränderungen des Glucose-Gehaltes von nass (W und P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kapitel 2.3) (Zeitachse nicht linear). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Ausgangsmaterials.

Betrachtet man den gesamten Lagerungszeitraum, so ist trotz starker Schwankungen erkennbar, dass der Gehalt an Glucose in trocken aufbereiteten Rohkaffees allmählich abnimmt. Auch bei Rohkaffees, die nach der semi-dry Methode aufbereitet wurden, sind abnehmende Tendenzen zu erkennen. Doch sind diese Abnahmen nicht stark genug, um die Unterschiede, die durch die Aufbereitung in den Bohnen hervorgerufen wurden, zu nivellieren. Die Werte bei den nass aufbereiteten erscheinen relativ gleichförmig und es lässt sich feststellen, dass der Glucose-Gehalt in den nass aufbereiteten Rohkaffees auf dem ursprünglichen, niedrigen Niveau verbleibt.

b) Fructose

Auch bei der Fructose bestätigen die Analysenwerte die während der Aufbereitungen entstandene Unterscheide.

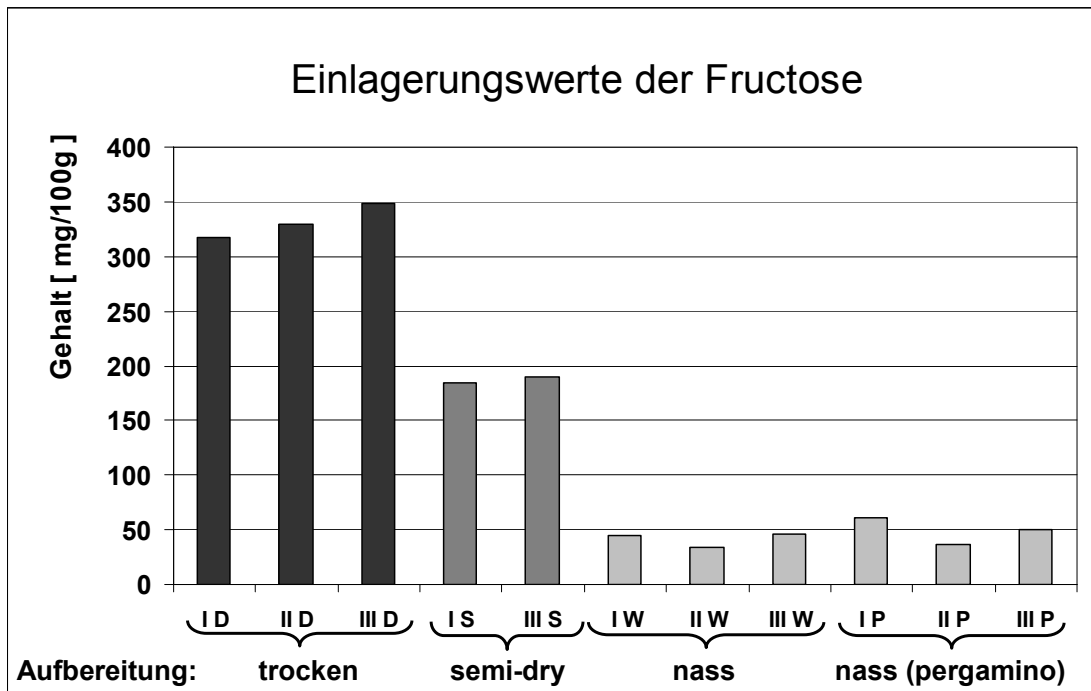


Abb. 61: Veränderungen des Fructose-Gehaltes von nass (W und P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kapitel 2.3). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Ausgangsmaterials.

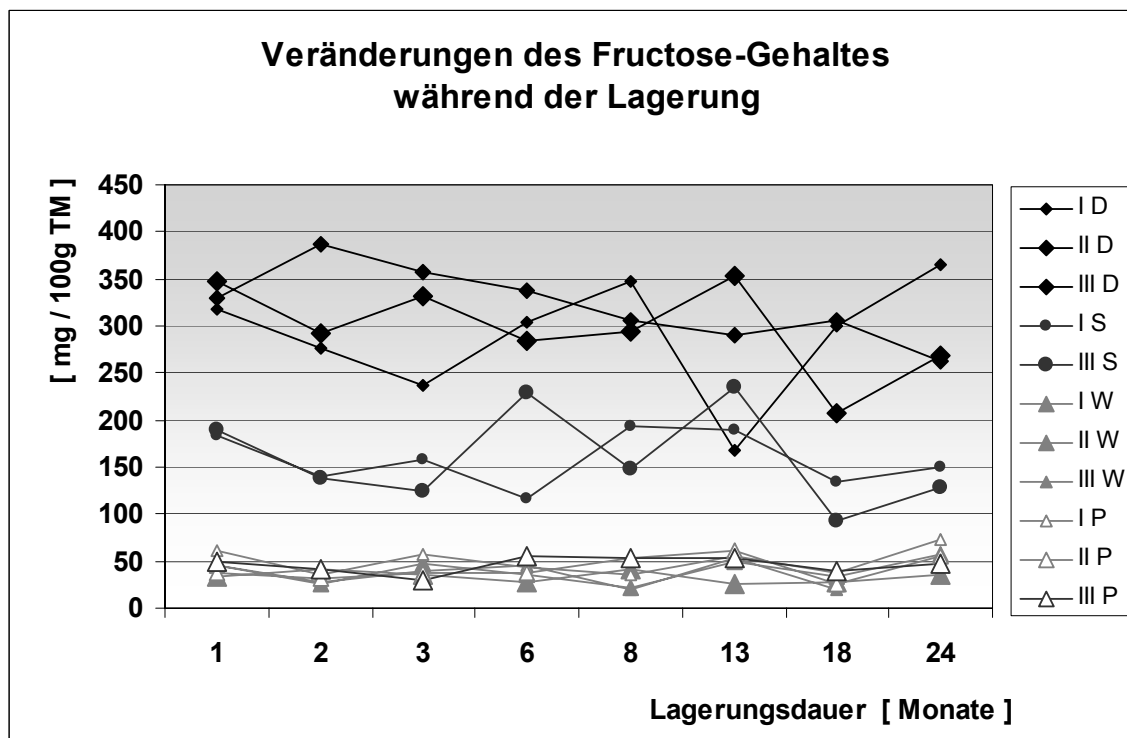


Abb. 62: Veränderungen des Fructose-Gehaltes von nass (W+P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kap. 2.3) (Zeitachse nicht linear). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Ausgangsmaterials.

Diese Konzentrations-Unterschiede blieben zudem komplett über die ganze Lagerungszeit erhalten. Denn im Gegensatz zu den Gehalten der Glucose ist bei den Fructose-Gehalten kein so deutliches Absinken der Konzentrationen in den trocken oder in den semi-dry aufbereiteten Bohnen zu beobachten.

c) Galactose und Mannose

Bei der Galactose war während der Aufbereitung ein Absinken festgestellt worden - und zwar im gleichen Maße bei nasser wie trockener Aufbereitung. Auch in den untersuchten Proben aus den Feldversuchen sind gleiche Gehalte an Galactose in den unterschiedlich aufbereiteten Rohkaffeeproben wieder gefunden worden. Ohne einen Vergleich mit der unbehandelten Frischprobe kann jedoch nur gemutmaßt werden, dass diese Gehalte ebenfalls Folge eines Absinkens während der Aufbereitung sind. Abgesehen von zwei "Ausreißern" der Charge I D verlaufen die Werte der Galactose gleichförmig: Auffällig ist, dass fast alle Proben nach etwa sechs Monaten ein Maximum aufweisen. Dieses Maximum korreliert nicht mit einem Maximum in der α -Galactosidase-Aktivität (Abb. 42 bis Abb. 45). Möglicherweise sind andere Begleitumstände für den vorübergehenden Anstieg der Galactose-Gehalte verantwortlich zu machen. Es ist beispielsweise denkbar, dass dies mit dem in die gleiche Zeit fallenden Absterben vieler Samen zusammen hängen könnte. Dagegen spricht allerdings, dass dieses Verhalten auch bei den zu weiten Teilen noch nicht abgestorbenen Samen zu beobachten war, die im Pergamino gelagert worden waren.

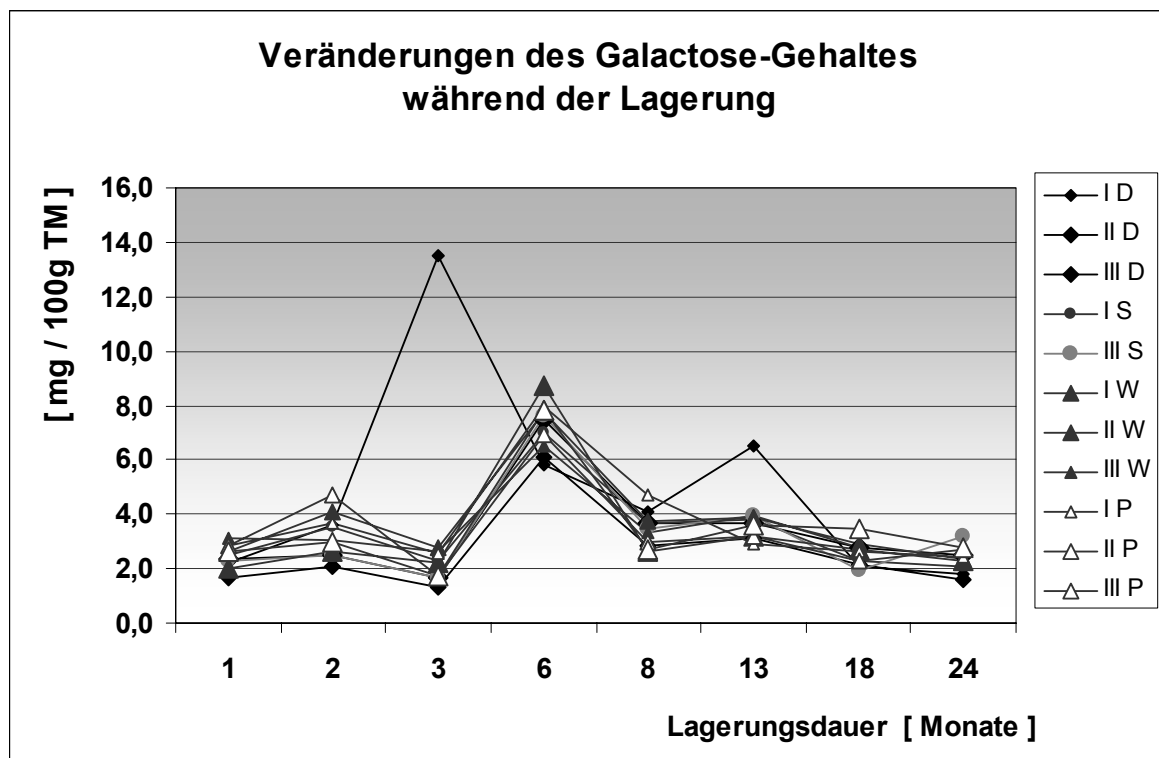


Abb. 63: Veränderungen des Galactose-Gehaltes von nass (W+P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kapitel 2.3) (Zeitachse nicht linear). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Probenmaterials.

Die Mannose-Gehalte verhalten sich während der Lagerung eher unauffällig; es sind von vornherein nur sehr geringe Mannose-Gehalte in den Bohnen feststellbar ($< 1 \text{ mg}/100 \text{ g}$). Da sich die Konzentration im Verlauf der 24 Monate nicht verändert, wird hier auf eine graphische Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

d) Arabinose

Auch bei der Arabinose zeigen die brasilianischen Anfangsproben der Lagerung in die gleiche Richtung wie die mexikanischen und tansanischen Modellaufbereitungsproben. Die Werte der trockenen aufbereiteten Rohkaffees liegen leicht über denen der nass aufbereiteten. Bei Arabinose ist zusätzlich als einzigem Zucker ein evtl. aufbereitungsbedingt abweichendes Lagerungsverhalten zu erkennen. Bei keinem anderen Zucker sind die Gehalte zu Beginn der Lagerung so ähnlich, und entwickeln sich dann scherenartig je nach Aufbereitungsform auseinander, wobei erneut die intermediäre Aufbereitungsform semi-dry auch die Bohnen mit den intermediären Werten liefert (siehe Abb. 64).

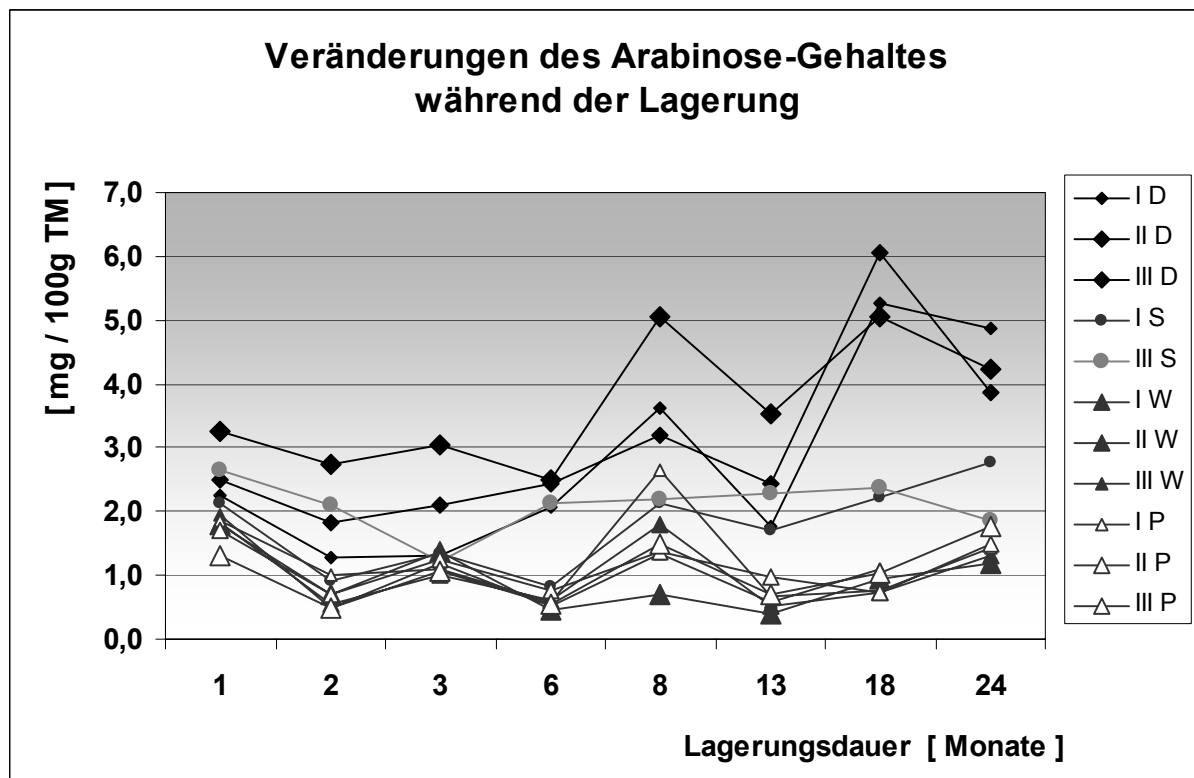


Abb. 64: Veränderungen des Arabinose-Gehaltes von nass (W+P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kap. 2.3) (Zeitachse nicht linear). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Probenmaterials.

e) Auswirkungen von Hydrolysen

Prüft man, ob eine Korrelation zwischen den lagerungsbedingten Konzentrationsänderungen von Arabinose, Galactose und Mannose und den enzymatischen Aktivitäten bestehen, so wird deutlich, dass sich die Konzentrationsveränderungen bei Galactose, Arabinose und Mannose nicht mit den

gleichfalls aufgenommenen Werten zur Enzymatik korrelieren lassen. Prinzipiell wäre denkbar, dass die jeweils durch den Reservestoffabbau gebildeten Produkte (Galactose, Arabinose und Mannose) umgehend weiter verstoffwechselt werden. Dies würde mit dem Absterben der Zellen allerdings unterbleiben und zu einer Akkumulation führen. Ob die nach dem Absterben vieler Samen (nach sechs Monaten) auftretende erhöhte Konzentration an Galactose tatsächlich darauf zurückgeführt werden kann, dass zu dieser Zeit noch ein hydrolytischer Abbau der Galactomannane stattfindet, bleibt fraglich. In diesem Fall hätte der erhöhte Galactose-Gehalt im Laufe der Lagerung erhalten bleiben müssen, doch es wurde ein Konzentrationsrückgang beobachtet.

f) Rhamnose

Rhamnose zeigt ein von den anderen löslichen Zuckern stark abweichendes Verhalten. Die Rhamnose-Gehalte verändern sich in den ersten Monaten der Lagerung kaum, steigen dann aber zum Ende der Lagerungsperiode bei allen Rohkaffees aus den verschiedenen Aufbereitungen signifikant an. Rhamnose kommt, ebenso wie Arabinose nur in sehr geringen Mengen vor. Angesichts dieser Daten stellt sich die Frage, ob Rhamnose als Marker für überlang gelagerten Rohkaffee dienen könnte.

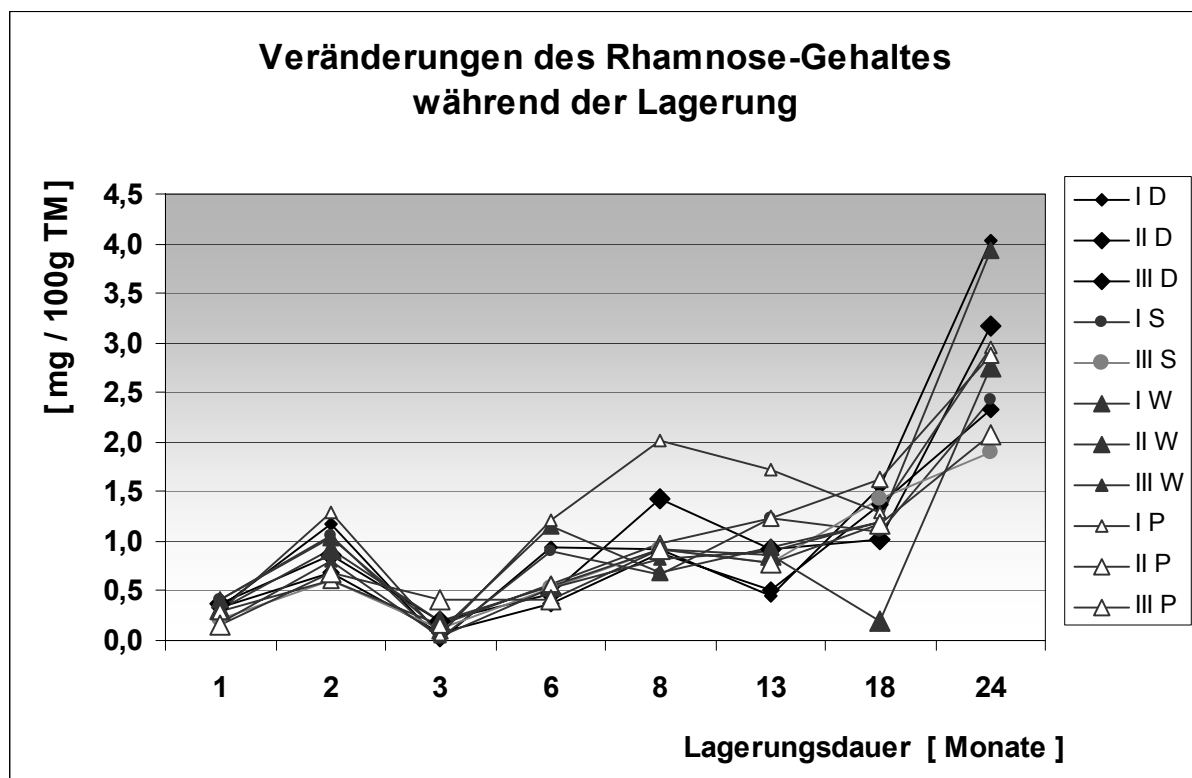


Abb. 65: Veränderungen des Rhamnose-Gehaltes von nass (W+P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kapitel. 2.3) (Zeitachse nicht linear). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Probenmaterials.

g) Stachyose und Raffinose

Stachyose und Raffinose, deren Vorkommen im Kaffee bisher noch nicht endgültig gesichert war, wurden in extrem schwankenden Gehalten in den Rohkaffees festgestellt (Stachyose: 45 – 58 mg/100 g TM; Raffinose: 53 - 106 mg/100 g TM). Aufgrund der extrem hohen Schwankungsbreiten insbesondere bei Raffinose können keinerlei Veränderungen, die mit Lagerungsdauer oder Aufbereitungsart zusammen hängen, nachgewiesen werden. Deshalb wird hier auf eine graphische Darstellung verzichtet.

h) Saccharose

Die gemessenen Gehalte an Saccharose schwanken während der zwei Jahre ebenfalls stark. Die Verläufe sind gleichförmig. Weder aufbereitungs- noch lagerungsspezifische Einflüsse sind deutlich erkennbar. Eine Zeitabhängigkeit ist ebenso nicht sichtbar.

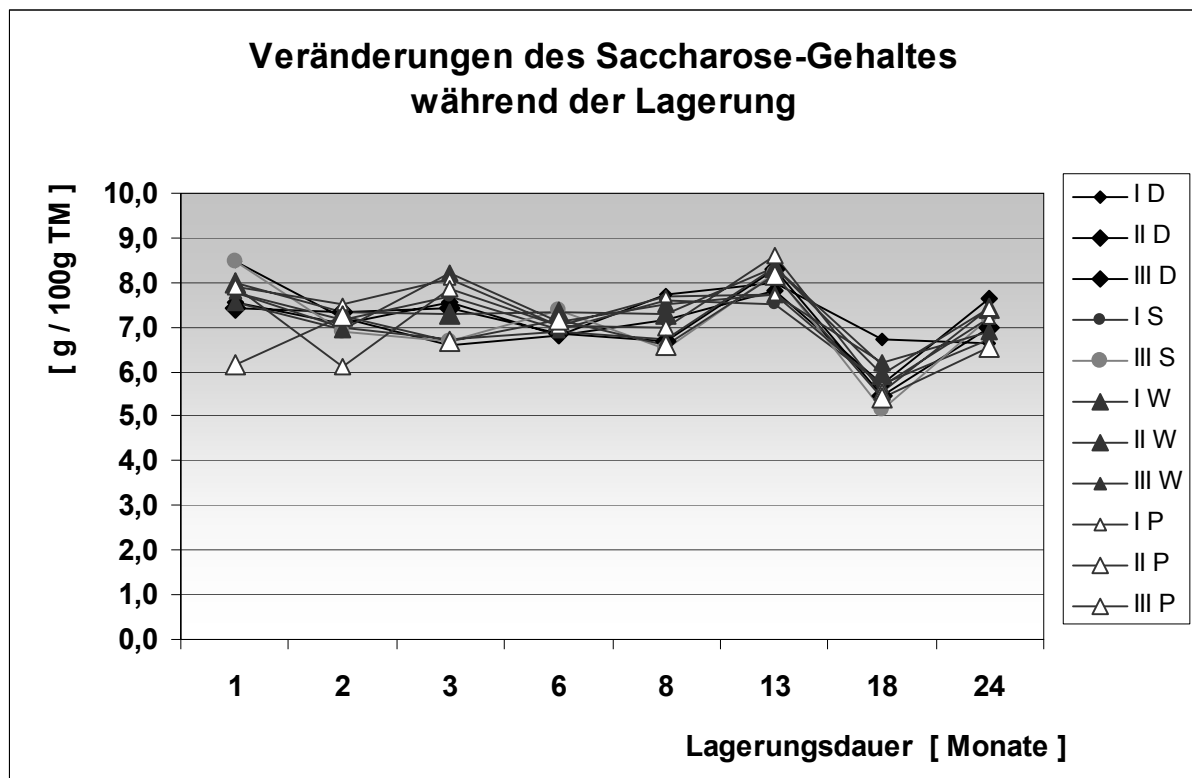


Abb. 66: Veränderungen des Saccharose-Gehaltes von nass (W+P), trocken (D) und semi-dry (S) aufgearbeiteten Rohkaffee-Bohnen während zweijähriger Lagerung unter definierten Bedingungen (siehe Kap. 2.3) (Zeitachse nicht linear). Die römische Zahl markiert jeweils die Zugehörigkeit zu einer der drei Chargen identischen Ausgangsmaterials.

Des Weiteren sind keinerlei Beziehungen zwischen Veränderungen im Saccharose-Gehalt und Veränderungen in Fructose- bzw. Glucose-Gehalt zu erkennen. Signifikante Abnahmen im Saccharose-Gehalt sollten sich in den Gehalten dieser Zucker niederschlagen. Da ein solcher Anstieg nicht festzustellen ist, kann der auffällige Abfall in der Saccharose-Konzentration nach 18 Monaten Lagerung nicht als signifikant angesehen werden. Darüber hinaus sind zu diesem Zeitpunkt fast alle

Samen abgestorben und folglich nicht zu einer Neusynthese von Saccharose in der Lage.

Die in der Literatur beschriebenen hohen Schwankungen im Saccharose-Gehalt können bei dieser Analysenreihe bestätigt werden [86].

3.3.3 Sensorische Eigenschaften

Zwei der drei Chargen des frisch aufbereiteten Kaffees wurden zunächst von den professionellen Verkostern der *Ipanema* in Brasilien verkostet. Dabei zeigte sich, dass die jeweiligen Proben den typischen Aromaprofilen von nass und trocken aufbereiteten Rohkaffees entsprechen. So haben die nass aufbereiteten Kaffees gute Säure und gutes Aroma, dafür weniger *body* (engl.: Körper). Die trocken aufbereiteten Kaffees hingegen zeichnen sich vor allem durch ihren starken *body* aus. Der aus der semi-dry Aufbereitung resultierende Kaffee ist auch bezüglich des Aromas intermediär: Er hat eine relativ gute Säure und einen ausgewogenen Körper.

Natural-Kaffee repräsentiert den "eigentlichen" trocken aufbereiteten Kaffee: Bei seiner Aufbereitung werden, im Gegensatz zur experimentellen trockenen Aufbereitung, alle Früchte ohne Sortierung und somit ungeachtet eventueller Reifeunterschiede auf der Terrasse getrocknet (siehe Abb. 23). Der sensorische Vergleich zeigt, dass er prinzipiell ähnliche Geschmacks-Charakteristiken aufweist wie der trocken aufbereitete Kaffee, der vor der Aufbereitung sortiert worden war. Er hat einen mittleren Körper, schwache Säure und zeigt dabei ein gutes Aroma.

	Aufbereitung / Charge	Bewertung	
		deutsch	english
Identisches Ausgangsmaterial	nass I (gewaschen)	gutes Aroma, leicht süß, schwacher Körper, gute Säure	fine cup, sweet, good acidity, low body, good aroma
	nass II (gewaschen)	gutes Aroma, etwas süßer als nass I, schwacher Körper, gute Säure	fine cup, more sweetness than nass I, good acidity, low body, good aroma
	trocken I (ausschließlich reife Kirschen)	gutes Aroma, leicht süß, leicht fermentiert, starker Körper	good cup, adstringent, hardly sweet, slightly fermented, strong body, good aroma
	trocken II (ausschließlich reife Kirschen)	gutes Aroma, etwas süßer als trocken I, leicht fermentiert, starker Körper	fine cup, good acidity, good body, more sweetness than trocken I, good acidity
	semi-washed I (fermentationslose Nass-Aufbereitung)	gutes Aroma, süß, gute Säure, ausgewogener Körper	fine cup, sweet, good acidity, balanced body, good aroma
	natural (unsortierte Kirschen, trockene Aufbereitung)	gutes Aroma, Körper und Säure mittelmäßig, mäßig süß	good cup, medium body, medium acidity, med. sweetness, good aroma
Früchte aller Reifestadien			

Abb. 67: Verkostungsergebnisse durch die professionellen Verkoster der *Ipanema* in Brasilien direkt nach Ende der Aufbereitungen.

Dieser Befund belegt, dass die wesentlichen Charakteristiken, die in der Tassenqualität die Unterschiede eines gewaschenen bzw. ungewaschenen Kaffees repräsentieren, auch dann erzielt werden, wenn identisches Material verwendet wird. Damit ist die These widerlegt, dass es die Unterschiede im Ausgangsmaterial sind, die die wesentlichen Geschmacksunterschiede von nass und trocken aufbereitetem Kaffee in der Tasse ausmachen. Vielmehr liegen die Ursachen für die Geschmacksunterschiede in den Unterschieden der Aufbereitungen selbst.

Die erfahrenen Verkoster der *Fazenda* können die feinen Nuancen der Kaffees besser herausschmecken, da sie die Proben nicht in Relation zu anderen Kaffeesorten beurteilen, sondern spezialisiert sind auf die Unterschiede der Kaffees dieses speziellen Ursprungs.

Anhand dieser Daten wird auch deutlich, dass die Aufbereitungen typische Kaffees ergaben - also authentisch und erfolgreich durchgeführt wurden.

Bei den Verkostungen der gelagerten Kaffeeproben ergab sich, dass die Werte für Säure und Aroma der Röstkaffees aus den brasilianischen Einlagerungsproben, wie es für brasilianischen Kaffee zu erwarten ist, eher am Ende der Intensitätsskala zu finden sind. Wie bereits in Kapitel 2.2 ausgeführt, repräsentiert der brasilianische Kaffee keine Spitzenqualität wie z.B. die Hochlandkaffees aus Kolumbien.

Auch die Verkoster der deutschen Kaffeeindustrie bestätigen die aus den verschiedenen Aufbereitungen hervorgegangenen unterschiedlichen Qualitäten. Nass und trocken zeigen aufbereitungsabhängige Unterschiede. Darüber hinaus wurden auch Unterschiede deutlich, die mit der Lagerungsdauer zusammenhängen. So fällt das Aroma vor allem nach dem 8. Monat bei fast allen Kaffees ab. Es ist aber auch offenkundig, dass die Ergebnisse mit starken Schwankungen innerhalb der Chargen verbunden sind.

Zudem ist auffällig, dass die starken geschmacklichen Unterschiede zwischen den verschiedenen Aufbereitungsarten in der Verkostung durch den Industriepartner weniger deutlich zu Tage treten als bei den Verkostungsergebnissen bei der *Ipanema* (siehe Abb. 67). Dies und auch das uneinheitliche Bild der Verkostungsergebnisse, erklärt sich vor allem dadurch, dass – wie oben bereits erwähnt – die brasilianischen Verkoster vor Ort stets nur die Kaffees der Plantage miteinander vergleichen, während die deutschen Verkoster immer die gesamte Palette an importierten Provenienzen einander gegenüber stellen. Dabei können Nuancen innerhalb einer einzigen Provenienz nicht so deutlich unterschieden werden, insbesondere wenn die Kaffees generell nicht den Spitzenqualitäten zugeordnet werden können, was leider bei Proben aus Kaffee, der nur in etwa 600 m ü.N.N. gewachsen ist, der Fall ist.

Zusammenfassend kann bei den Ergebnissen der Verkostung der gelagerten Kaffeeproben insgesamt eine Verschlechterung der Qualität im Laufe der Lagerung

festgestellt werden. Zwischen den nass aufbereiteten Proben, die in der Pergamenthülle gelagert wurden (und dadurch deutlich länger vital blieben, siehe Abb. 35), und denen, die ohne diese Schutzhülle gelagert wurden, konnten Unterschiede festgestellt werden. Vor allem beim Aroma gibt es nach einem Jahr Vorteile für den in der Hornschale gelagerten Kaffee.

Tab. 14: Übersicht zu den Verkostungsergebnissen (zur Aufschlüsselung siehe Tab. 1)

Proben:	Lagerungsdauer in Monaten	1D	2D	3D	1W	2W	3W	1S	3S	1P	2P
Fülle	0	9	7	8	7	5	9	9	7	9	7
	1	5	7	9	5	9	7	9	7	9	7
	6	7	7	7	9	5	9	7	7	9	5
	8	7	5	9	5	9	5	5	5	5	7
	12	7	7	9	5	5	9	9	7	9	5
Säure	0	1	4	1	3	1	1	1	3	1	4
	1	1	3	1	3	1	1	1	4	2	1
	6	1	3	1	3	1	3	1	3	2	1
	8	2	3	1	2	1	2	2	1	2	1
	12	1	2	1	3	1	3	1	3	1	3
Aroma	0	3	5	1	4	1	3	1	3	3	4
	1	1	1	1	3	1	3	3	5	3	3
	6	1	3	1	3	1	3	1	3	2	1
	8	1	1	1	3	1	3	1	3	3	1
	12	1	3	1	1	1	1	1	1	1	3
Weich	0		SS		SS		SS		SS		SS++
	1		SS		SS		SS	SS			
	6		SS		SS		SS		SS	SS	
	8				SS			SS	SS	SS	
	12		SS		SS		SS		SS		SS

Tab. 15: Anmerkungen zu den trocken aufbereiteten Brasils.

Proben:	Lagerungsdauer in Monaten	1D	2D	3D
2. Serie	0	leicht rau		rau, kratzig
3. Serie	1	Gewürznote	Gewürznote	leicht rau
4. Serie	6	rau, kratzig		rau
5. Serie	8	Fremdnote, muffig	Fremdnote, muffig	leicht rau
6. Serie	12	sehr rau	leicht rohalt	leicht rau

Tab. 16: Anmerkungen zu den nass aufbereiteten Brasils (im geschälten Zustand gelagert).

Proben:	Lagerungsdauer in Monaten	1W	2W	3W
2. Serie	0	Breit	leicht rau, leicht rohalt	Breit
3. Serie	1		leicht rau, Gewürznote	leichte Gewürznote
4. Serie	6	rohalt	Rohalt, rau	rohalt
5. Serie	8	leicht roh-alt	Gewürznote	
6. Serie	12	rohalt	roh-alt	rohalt

Tab. 17: Anmerkungen zu den semi-dry Brasils.

Proben:	Lagerungsdauer in Monaten	1S		3S
2. Serie	0	rau, kratzig		
3. Serie	1			Gut
4. Serie	6	rau, kratzig		
5. Serie	8	leicht rohalt		
6. Serie	12	leicht rau, Beinote		Rohalt

Tab. 18: Anmerkungen zu den nass aufbereiteten Brasils (als Pergamino gelagert)

Proben:	Lagerungsdauer in Monaten	1P	2P	3P
2. Serie	0	leicht rau		rau, leicht rohalt
3. Serie	1	leicht rau, leicht rohalt	leicht rau	
4. Serie	6		rau	rau, leicht rohalt
5. Serie	8		leicht rau	rau, leicht rohalt
6. Serie	12	rau, kratzig	rohalt	ranzig

Da sich aus den Daten der Zuckeranalysen nur wenige lagerungsbedingte Änderungen ableiten ließen, kann eine Korrelation zwischen den in der Praxis beobachteten Verflachungsprozessen und einem Anstieg oder Absinken der Gehalte an niedermolekularen Kohlenhydraten nicht bestätigt werden.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Verkostungen der Rohkaffees aus den Lagerungsproben aus den oben genannten Gründen keine eindeutigen Befunde ergaben. Um speziell den Verflachungseffekt neben weiteren lagerungsbedingten Veränderungen im Geschmack bestimmen zu können, müsste hochwertiger Hochlandkaffee verwendet werden, bei dem diesbezügliche Unterschiede in der Tassenqualität deutlicher zu Tage treten sollten, als bei dem verwendeten Brasil-Kaffee. Einflüsse anderer chemischer Veränderungen, wie Oxidation von Chlorogensäuren und Lipidoxidation (Effekt: roh-alt), die in der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht werden konnten, aber von den Verkostern nicht ausgeblendet werden konnten, hatten zweifellos ebenfalls ihre Auswirkung auf die Verkostungsergebnisse. Dadurch wurde möglicherweise der schwächere Eindruck der Aromaverflachung überdeckt.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Analysen wichtiger Aromavorstufen während Aufbereitung und Lagerung von Rohkaffee

Die Unterschiede während der beiden traditionellen Aufbereitungen bezüglich der freien Aminosäuren sind in erster Linie durch den massiven Anstieg des GABA-Gehaltes charakterisiert. Dieser entsteht vermutlich während der Trocknung aufgrund eines einsetzenden Stressmetabolismus. Dabei wird GABA durch die α -Decarboxylierung von Glutaminsäure gebildet.

Bei einigen anderen Aminosäuren ist lediglich im Vergleich zu frischen Kirschen während der Aufbereitungen ein leichter Anstieg zu erkennen, der jedoch weder aufbereitungsspezifisch zu sein scheint, noch mengenmäßig vergleichbar mit dem GABA-Anstieg wäre. Außerdem liegt bei den Aminosäuren wie schon BYTOF (2003) [15] feststellte eine sehr große Schwankungsbreite sowohl zwischen verschiedenen Provenienzen als auch innerhalb einer einzigen Provenienz vor.

Auf der Ebene der Aminosäuren lassen sich Unterschiede im physiologischen Status nur soweit nachweisen wie sie den Stressmetabolismus betreffen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Keimungsmetabolismus *per se* und dem Gehalt an freien Aminosäuren kann nicht belegt werden. Allerdings könnte argumentiert werden, dass einsetzende Keimung Voraussetzung für das Auftreten eines Stressmetabolismus ist.

Während der Lagerung zeigen sich bezüglich der Aminosäuren keinerlei bedeutende Veränderungen. Die Gehalte schwanken unabhängig von Aufbereitungs- und Lagerungsform; im Durchschnitt bleiben sie aber in etwa auf dem Niveau, das sie zu Beginn der Lagerung hatten.

Die gefundenen Unterschiede in den verschiedenen aufbereiteten Rohkaffees bezüglich der löslichen Zucker sind jedoch massiv. In dieser Arbeit können erstmals signifikante stoffliche Unterschiede zwischen den verschiedenartig aufbereiteten Rohkaffees auf der Ebene der Kohlenhydrate dokumentiert werden. Diese Unterschiede treten vor allem beim Vergleich der Glucose- und Fructose-Konzentrationen zu Tage. Es ist unverständlich, warum bis dato dieser Sachverhalt in der Literatur nicht realisiert wurde. Die Analysen lassen erkennen, dass die aufgezeigten Unterschiede auf ein verschieden starkes Absinken der Konzentrationen einzelner Zucker während der Aufbereitung zurückzuführen sind. So wird in beiden durchgeführten nassen Laboraufbereitungen mit Kaffees aus Mexiko und Tansania eine starke Abnahme an Glucose und Fructose auf etwa 10 % des Ausgangswertes festgestellt. Bei den parallel trocken aufbereiteten Proben sind diese Abnahmen im Gegensatz dazu nicht nachweisbar. Diese eindeutigen Unterschiede lassen sich ebenfalls in den brasilianischen Proben, die für die Lagerungsexperimente genutzt wurden, nachweisen.

Ein ähnliches Verhalten zeigen – wenn auch nicht ganz so ausgeprägt – die mengenmäßig weniger bedeutenden Zucker Arabinose und Mannose. Hierbei fallen zwar auch die Gehalte bei der trockenen Aufbereitung, jedoch bei weitem nicht so stark wie bei den nassen aufbereiteten Proben. Bei der Galactose ist der Einfluss der Aufbereitung ebenfalls nachweisbar, jedoch wirkt er sich hier bei beiden Aufbereitungsformen etwa gleich aus. Die Gehalte verringern sich während der Aufbereitung jeweils auf etwa ein Drittel. Die Saccharose-Gehalte, die mengenmäßig bei weitem am bedeutendsten sind (~7 % der Trockenmasse der Bohnen), zeigen keinerlei aufbereitungsbedingte Veränderungen.

Vor allem die bei den Glucose- und Fructose-Gehalten gefundenen Unterschiede deuten auf einen sehr aktiven Stoffwechsel während der Aufbereitung hin. Dieser bewirkt einen Zuckerabbau in den Bohnen. Je nachdem, ob dieser Stoffwechsel aerob (trockene Aufbereitung – Atmung) oder anaerob (nasse Aufbereitung [Unterwasserfermentation] – Gärung) abläuft, ist der Verbrauch dieser Zucker zur Erzeugung äquivalenter Energiemengen kleiner oder größer. Dieser aktive Zuckerstoffwechsel belegt eine einsetzende bzw. fortlaufende Keimung und bestätigt damit die Befunde der ICL- und der β -Tubulin-Analytik. Allerdings gibt es keinen Hinweis auf einen Abbau der Kohlenhydrat-Reserven. Es ist zwar möglich, dass die Kohlenhydrat-Reserven simultan abgebaut und sofort verstoffwechselt werden, jedoch ist dies angesichts der Tatsache, dass keine steigenden Gehalte der Monozucker gefunden werden, unwahrscheinlich.

In einer früheren Arbeit [150], wurde ein im Laufe der Fermentation auftretender Verlust an löslicher Festsubstanz (*soluble solids*) festgestellt und zu einem Drittel dem Verlust von löslichen Zuckern zugeschrieben. Jedoch bleibt die Schlussfolgerung, dass dies über ein Auswaschen aus der Bohne geschieht, fraglich,

vor allem da der Hauptzucker Saccharose und auch einige andere lösliche Zucker durch die Aufbereitung unverändert bleiben.

Zum Einfluss der Aufbereitung auf die Gehalte der löslichen Zucker lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei der nassen Aufbereitung die Gehalte einiger Zucker rapide abfallen (Glucose, Fructose, Galactose). Die Gehalte anderer Zucker (Arabinose, Mannose) fallen weniger stark aber immer noch deutlich stärker als dies bei der trockenen Aufbereitung der Fall ist. Bei den parallel trocken aufbereiteten Proben fanden sich lediglich leichte Abnahmen in den Gehalten der Arabinose und Mannose sowie ein dem der nassen Aufbereitung entsprechender Abfall bei den Galactose-Gehalten. Die der Glucose- und Fructose-Gehalte und leicht eingeschränkt die Arabinose- und Mannose-Gehalte zeigen somit eindeutige (aufbereitungs-) methodenspezifische Unterschiede in den resultierenden Zuckerspektren auf.

Bei den Daten zur Lagerung lassen sich neben den Unterschieden, die mit den unterschiedlichen Aufbereitungen korreliert werden können, keine weiteren grundsätzlichen Divergenzen zwischen den Rohkaffees erkennen. Es lassen sich keine hydrolytischen Abbauprozesse im Zuge der Lagerung nachweisen, auch nicht *postmortem*. Denn obwohl die Samen nach etwa drei bzw. zwölf Monaten abgestorben und folglich die Zellen zunehmend dekompartimentiert sind, während gleichzeitig die Enzyme β -Mannanase und α -Galactosidase noch Aktivität zeigen (siehe Kapitel 3.2.2), ist dennoch kein Anstieg der Hydrolyseprodukte zu verzeichnen. Offensichtlich ist demnach der Wassergehalt zu niedrig, sodass die Enzyme nicht mit den Substraten in Kontakt kommen.

4. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Ursachen für die unterschiedlichen Qualitätsmerkmale nass und trocken aufbereiteter Rohkaffees untersucht. Darüber hinaus wurden Änderungen der Rohkaffees im Zuge der Lagerung verfolgt.

Als bedeutsamstes Ergebnis dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die bekannten aufbereitungsspezifischen Unterschiede der Rohkaffeequalität auf unterschiedliche Stoffwechselzustände der Kaffeebohnen zurückzuführen sind. Unter Zuhilfenahme biochemischer und molekularbiologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass in den Kaffeesamen während der Nachernteprozesse sowohl ein Keimungsstoffwechsel als auch ein Stressmetabolismus abläuft. Diese unterschiedlichen Stoffwechselsituationen manifestieren sich in der Zusammensetzung potentieller Aromavorstufen. Entsprechende Unterschiede wurden besonders deutlich bei den Glucose- und Fructose-Konzentrationen und der Menge an akkumulierten Aminosäuren, wobei die Unterschiede in der GABA-Konzentration besonders stark ausgeprägt sind. Diese Zusammenhänge erlauben erstmals eine wissenschaftlich fundierte Erklärung für die bekannten Qualitätsunterschiede nass und trocken aufbereiteter Rohkaffees und widerlegen damit die althergebrachte These, die entsprechenden Qualitätsunterschiede seien lediglich auf unterschiedliches Ausgangsmaterial zurückzuführen.

Die Ergebnisse im Einzelnen:

- Unter Verwendung von identischem Ausgangsmaterial konnte erstmals belegt werden, dass die bekannten Qualitätsunterschiede von nass und trocken aufbereiteten Rohkaffees bzw. deren charakteristische Aromaausprägung direkt auf Stoffwechselvorgänge in der Kaffeebohne zurückzuführen sind und nicht auf Unterschiede im Ausgangsmaterial.
- Die während der Aufbereitung ablaufenden Stoffwechselprozesse basieren sowohl auf einer Keimung als auch auf einem Stressmetabolismus.
- Der Keimungsstoffwechsel konnte anhand der Expression der keimungsspezifischen ICL und der Wiederaufnahme der Zellzyklusaktivität nachgewiesen werden. Dabei wurde die einsetzende Zellteilung zum einen über die Menge des zur Ausprägung des Spindelapparates notwendigen β -Tubulins bestimmt und zum anderen über die Verdoppelung des Chromatidenmaterials.
- Eine zeitabhängige Quantifizierung dieser Keimungsprozesse ergab, dass der zeitliche Ablauf der Keimung in nass und trocken aufbereiteten Rohkaffee deutlich unterschiedlich ist. Das Maximum liegt bei der nassen Aufbereitung zwei Tage nach Beginn der Aufbereitung, während die Stoffwechselaktivität im Zuge der trockenen Aufbereitung erst nach fünf bis sieben Tagen ihr Maximum erreicht.

- Die Stoffwechselunterschiede manifestieren sich in ungleichen Zusammensetzungen potentieller Aromavorstufen:
Bei den Kohlenhydraten ist während der nassen Aufbereitung ein deutliches Absinken der Gehalte vor allem an Glucose und Fructose im Vergleich zu frischen oder trocken aufbereiteten Bohnen nachweisbar. Die Gehalte von Arabinose und Mannose fallen während einer nassen Aufbereitung stärker als bei einer trockenen und bei der Galactose ist festzustellen, dass die Gehalte bei einer nassen und bei einer trockenen Aufbereitung in etwa gleich stark fallen. Daraus, dass die Gehalte aller Zucker entweder fallen oder in etwa konstant bleiben, kann gefolgert werden, dass trotz vorhandener Enzymaktivitäten kein Reservestoff-Abbau stattfindet.
Bei den Aminosäuren zeigen sich Unterschiede in erster Linie durch den im Laufe der trockenen Aufbereitung stark steigenden GABA-Gehalt. Auch für diesen Stressmetabolismus gibt es je nach Aufbereitung unterschiedliche Zeitfenster. In dem durch die langsamere Trocknung bedingten längeren Zeitraum für eine GABA-Produktion im Zuge der trockenen Aufbereitung können massive Unterschiede im GABA-Gehalt von trocken und nass aufbereitetem Rohkaffee entstehen. Damit wird die Bedeutung der Trocknung während der Rohkaffee-Nacherntebehandlung erkennbar.
- Das bedeutsamste Ergebnis im Hinblick auf die Lagerung ist, dass die Vitalität durch Lagerung der Bohnen in der schützenden Hülle des Endokarps im Vergleich zu geschält gelagerten Rohkaffeebohnen etwa doppelt so lange erhalten bleibt. Darüber hinaus sind während der Lagerung weder in den löslichen Kohlenhydraten noch in den freien Aminosäuren Unterschiede feststellbar. Im vitalen Samen könnten Enzyme und Substrate in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sein, sodass es zu keinem Abbau kommen kann. Dass es auch nach der Dekompartimentierung zu keinem Abbau der Reservestoffe kommt, liegt wahrscheinlich an dem zu geringen Wassergehalt der Bohnen.

5. Literatur

1. **Jahresbericht 2003.** 2004, Deutscher Kaffee-Verband e.V.: Hamburg.
2. **Kaffeebibliothek.** 2005, Deutscher Kaffee-Verband e.V.: Hamburg, www.kaffeeverband.de
3. Barel, M. und M. Jacquet, **La qualité du café: ses causes, sa détermination.** Plantations, Recherche, Développement, 1994. 1(1): p. 5-13.
4. Rojas, J., **Green coffee storage**, in *Coffee: Growing, processing, sustainablen production*, J.N. Wintgens, Editor. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim. p. 733-750.
5. Blank, E., **Shipment of green coffee**, in *Coffee: Growing, processing, sustainablen production*, J.N. Wintgens, Editor. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim. p. 751-757.
6. Brando, C., **Harvesting and green coffee processing**, in *Coffee: Growing, processing, sustainablen production*, J.N. Wintgens, Editor. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim. p. 604-715.
7. Menchú, J.F. und C. Rolz, **Coffee fermentation technology.** Café Cacao Thé, 1973. 17(1): p. 53-61.
8. Wootton, A.E., **The storage of parchment coffee.** Kenya Coffee, 1970. 35(412): p. 144-147.
9. Illy, A. und R. Viani, eds. **Espresso coffee: the chemistry of quality.** 1995, Academic Press: London San Diego. 253.
10. Balzer, H.H., **Acids in Coffee**, in *Coffee. Recent Developments*, R.J. Clarke und O.G. Vitzthum, Editors. 2001, Blackwell Science: Oxford. p. 18-32.
11. Maier, H.G., **Kaffee.** Grundlagen und Fortschritte der Lebensmitteluntersuchung und Lebensmitteltechnologie. Vol. 18. 1981, Berlin Hamburg: Paul Parey. 199.
12. Sivetz, M. und N.W. Desrosier, **Harvesting and handling green coffee beans**, in *Coffee Technology*, M. Sivetz und N.W. Desrosier, Editors. 1979, The Avi Publishing Company, Inc.: Westport, Connecticut. p. 74-116.
13. Bytof, G., D. Selmar, und P. Schieberle, **New aspects of coffee processing: How do the different post harvest treatments influence the formation of potential flavour precursors?** Journal of Applied Botany - Angewandte Botanik, 2000. 74: p. 131-136.
14. Selmar, D., G. Bytof, und S.-E. Knopp. **New aspects of coffee processing: The relation between seed germination and coffee quality.** in *Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café*. 2002. Trieste, 14 - 18 mai 2001: ASIC, Paris.
15. Bytof, G., **Einfluss der Nacherntebehandlung auf die Qualitätsausprägung bei Arabica-Kaffee (Coffea arabica L.).** 2003, Technische Universität: Braunschweig.
16. Bytof, G., Knopp, S.-E., Schieberle, P., Teutsch, I., Selmar, D., **Influence of processing on the generation of γ -aminobutyric acid in green coffee beans.** European Food Research and Technology, 2005. 220: p. 245-250.
17. Speer, K. und P. Schieberle, **Klärung der Ursache holziger Fehlromanoten im Kaffeegetränk - Wege zu ihrer Vermeidung durch geeignete Lagerungsbedingungen bei Rohkaffee.** 2004, FEI: Bonn. p. 72.
18. Fourny, G., E. Cros, und J.-C. Vincent. **Étude préliminaire de l'oxydation de l'huile de café.** in *Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café*. 1983. Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982: ASIC, Paris.

19. Wilbaux, R. und D. Hahn, ***Contribution a l'étude des phénomènes intervenant au cours de la conservation du café vert.*** Café, Cacao, Thé, 1966. **10**(4): p. 342-367.
20. Walkowski, A., ***Changes in factors determining coffee bean quality during storage.*** Lebensmittelindustrie, 1981. **28**: p. 75-76.
21. Wurziger, J., R. Drews, und B. Suche, ***Über Röstkaffees aus abgelagerten Rohkaffees.*** Kaffee und Tee Markt, 1982. **32**(17): p. 3-5.
22. Wurziger, J., R. Drews, und B. Suche. ***Beiträge zur Qualitätsbeurteilung von Rohkaffee.*** in *Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café*. 1983. Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982: ASIC, Paris.
23. Bucheli, P., Meyer, I., Pasquier, M., Locher, R., ***Determination of soluble sugars by high performance anion exchange chromatography (HPAE) and pulsed electrochemical detection (PED) in coffee beans upon accelerated storage.*** Plant Physiology and Biochemistry, 1996. **Special Issue 10th FESPP Congress, Florence, Italy, Sept 9-13**: p. L-12 p.325.
24. Bucheli, P., Meyer, I., Pittet, A., Vuataz, G., Viani, R., ***Industrial storage of green Robusta coffee under tropical conditions and its impact on raw material quality and ochratoxin A content.*** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**(11): p. 4507-4511.
25. Huxley, P.A., ***Some factors which can regulate germination and influence viability of coffee seeds.*** Proc. Int. Seed Test Ass. (Wageningen), 1964. **29**(1): p. 33-60.
26. Van der Vossen, H.A.M., ***Methods of preserving the viability of coffee seed in storage.*** Kenya Coffee, 1980. **45**(526): p. 31-35.
27. Pokorny, J., et al., ***Non-enzymic browning XII. Maillard reactions in green coffee beans on storage.*** Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 1975. **158**: p. 87-92.
28. Sivetz, M. und N.W. Desrosier, ***Hulling, classifying, storing, and grading green coffee beans,*** in *Coffee Technology*, M. Sivetz und N.W. Desrosier, Editors. 1979, The Avi Publishing Company, Inc.: Westport, Connecticut. p. 117-169.
29. Flament, I., ***Coffee, cocoa, tea,*** in *Volatile compounds in food and beverages*, H. Maarse, Editor. 1996, Marcel Dekker Inc.: New York. p. 617-669.
30. Homma, S., ***Chemistry II: Non-volatile compounds, part II,*** in *Coffee. Recent Developments*, R.J. Clarke und O.G. Vitzthum, Editors. 2001, Blackwell Science: Oxford. p. 50-67.
31. Bradbury, A.G.W., ***Carbohydrates,*** in *Coffee. Recent Developments*, R.J. Clarke und O.G. Vitzthum, Editors. 2001, Blackwell Science: Oxford. p. 1-17.
32. Belitz, H.-D. und W. Grosch, ***Monosaccharide. Reaktionen mit Aminoverbindungen,*** in *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 1992, Springer: Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo. p. 245-257.
33. Angrick, M. und D. Rewicki, ***Die Maillard-Reaktion.*** Chemie in unserer Zeit, 1980. **14**(5): p. 149-157.
34. Trautwein, E.A. und H.F. Erbersdobler, ***Untersuchungen über das Verhalten von freien und gebundenen Aminosäuren während des Röstvorgangs.*** Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie, 1989. **43**: p. 44-45.
35. Trautwein, E.A. und H.F. Erbersdobler, ***Untersuchungen über den Gehalt an freien Aminosäuren in Arabica- und Robusta-Rohkaffee verschiedener Provenienzen.*** Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie, 1989. **43**: p. 45-46.

36. Trautwein, E., **Untersuchungen über den Gehalt an freien und gebundenen Aminosäuren in verschiedenen Kaffee-Sorten sowie über deren Verhalten während des Röstens**. 1987, Kiel.
37. Macdonald, I.A. und R. Macrae. **The determination of amino acids in coffee products**. in *Onzième Colloque Scientifique International sur le Café*. 1986. Lomé, 11-15 février 1985: ASIC, Paris.
38. Walter, W., H.G. Grigat, und J. Heukeshoven, **Über freie Aminosäuren im grünen Kaffee**. *Naturwissenschaften*, 1970. **57**: p. 246-247.
39. Tressl, R., M. Holzer, und H. Kamperschroer. **Bildung von Aromastoffen in Röstkaffee in Abhängigkeit vom Gehalt an Aminosäuren und Reduzierenden Zuckern**. in *Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café*. 1983. Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982: ASIC, Paris.
40. Barbiroli, G., **Contributio alla conoscenza degli aminoacidi liberi e combinati in alcuni tipi di caffè verdi e tostati**. *Rassegna Chimica*, 1965. **17**: p. 220-225.
41. Campos, L.S. und J.M.L. Rodrigues. **Application of chromatographic methods of analysis to free amino acids in green coffees**. in *Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés*. 1973. Lisbonne, 14-19 juine 1971: ASIC, Paris.
42. Pereira, A.J. und M.M. Pereira. **Amino acids present in coffees**. in *Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés*. 1973. Lisbonne, 14-19 juin 1971: ASIC, Paris.
43. Steinhart, H. und A. Luger. **Amino acid pattern of steam treated coffee**. in *Seizième Colloque Scientifique International sur le Café*. 1995. Kyoto, 9-14 avril 1995: ASIC, Paris.
44. Luger, A., **Entwicklung einer Analytik zum Nachweis einer Wasserdampfbehandlung von Kaffee**. 1996, Universität Hamburg.
45. Mazzafera, P., **Chemical composition of defective coffee beans**. *Food Chemistry*, 1999. **64**: p. 547-554.
46. Shimizu, M.M. und P. Mazzafera, **Compositional changes of proteins and amino acids in germinating seeds**. *Brazilian Archives of Biology and technology*, 2000. **43**(6): p. 259-265.
47. Casal, S., Oliveira, M.B.P.P., Alves, M.R., Ferreira, M.A., **Characterization of free amino acid enantiomers of Arabica and Robusta coffee varieties**. in *Dix-neuvième Colloque Scientifique International sur le Café*. 2002. Trieste, 14 - 18 mai 2001: ASIC, Paris.
48. Leloup, V., A. Louvrier, und R. Liardon. **Degradation mechanisms of chlorogenic acids during roasting**. in *Seizième Colloque Scientifique International sur le Café*. 1995. Kyoto, 9-14 avril 1995: ASIC, Paris.
49. Barbiroli, G., **Il contenuto in zuccheri nei caffè verdi e tostati**. *Rassegna Chimica*, 1965. **17**: p. 261-263.
50. Courtois, J.E., F. Percheron, und J.C. Glomaud, **Recherches préliminaires sur les oligo et polysaccharides du café vert (Coffea canephora var. robusta)**. *Café, Cacao, Thé*, 1963. **7**(3): p. 231-236.
51. Glomaud, J.C., F. Percheron, und J.E. Courtois. **Teneurs comparées en oligosaccharides de quelques variétés de café vert. Etude préliminaire des polysaccharides extractibles par l'eau**. in *Second Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés*. 1966. Paris, 3-7 mai 1965: IFCC, Paris.

52. Shadaksharaswamy, M. und G. Ramachandra, **Changes in the oligosaccharides and galactosidase of coffee seeds during soaking and germination.** Phytochemistry, 1968. **7**: p. 715-719.
53. Pictet, G. und A. Moreau. **Les glucides du café vert. Leur solubilisation a l'eau et leur évaluation quantitative.** in 4^{ème} Colloque international sur la chimie des cafés. 1970. Amsterdam 1969: ASIC.
54. Kröplien, U. **Monosaccharides in coffees and coffee substitutes.** in Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés. 1973. Lisbonne, 14-19 juin 1971: ASIC Paris.
55. Maier, H.G., I. Ollroge, und C. Balcke, **Freie Monosaccharide im Kaffee.** Kaffee und Tee Markt, 1982. **32**(8): p. 3-7.
56. Trugo, L.C. und R. Macrae. **The determination of carbohydrates in coffee products using High Performance Liquid Chromatography.** in Dixième Colloque Scientifique Internationale sur le Café. 1983. Salvador-Bahia, 11-14 octobre 1982: ASIC, Paris.
57. Trugo, L.C. und R. Macrae. **The use of the mass detector for sugar analysis of coffee products.** in Onzième Colloque Scientifique Internationale sur le Café. 1986. Lomé, 11-15 février 1985: ASIC, Paris.
58. Ollroge, I., **Aldosen und Oligosaccharide in Kaffee.** 1980, TU Braunschweig.
59. Silwar, R. und C. Lüllmann, **The determination of mono- and disaccharides in green Arabica and Robusta coffees.** Café, Cacao, Thé, 1988. **32**: p. 319-322.
60. Lüllmann, C. und R. Silwar, **Untersuchung des Mono- und Disaccharidgehaltes von Arabica- und Robustarohkaffee mittels HPLC.** Lebensmittelchemie und Gerichtliche Chemie, 1989. **43**: p. 42-43.
61. Luger, A. und H. Steinhart. **Carbohydrates in steam treated coffee.** in Seizième Colloque Scientifique Internationale sur le Café. 1995. Kyoto, 9-14 avril 1995: ASIC, Paris.
62. Rogers, W.J., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P., **Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (Coffea canephora) and Arabica (C. arabica) coffees.** Plant Science, 1999. **149**(2): p. 115-123.
63. Chabrilange, N., Dussert, S., Engelmann, F., Doulbeau, S., Hamon, S., **Desiccation tolerance in relation to soluble sugar contents in seeds of ten coffee (Coffea L.) species.** Seed Science Research, 2000. **10**(3): p. 393-396.
64. Casal, S., Alves, M.R., Mendes, E., Oliveira, M.B.P.P., Ferreira, M.A., **Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their amino acid enantiomers.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. **51**(22): p. 6495-6501.
65. Leloup, V., Gancel, C., Liardon, R., Rytz, A., Pithon, A., **Impact of wet and dry process on green coffee composition and sensory characteristics.** in 20^{ème} Colloque Scientifique Internationale sur le Café. 2005. Bangalore, India, Oct. 10-15 2004: ASIC, Paris.
66. Arnold, U., **Nachweis von Aminosäureveränderungen und Bestimmung freier Aminosäuren in Rohkaffee.** Beiträge zur Charakterisierung von Rohkaffeepeptiden. 1995, TU Dresden.
67. Arnold, U. und E. Ludwig, **Analysis of free amino acids in green coffee beans. II: Changes of the amino acid content in arabica coffees in**

- connection with post-harvest model treatment.** Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 1996. **203**: p. 376-384.
68. Arnold, U., Ludwig, E., Kühn, R., Möschwitzer, U., **Analysis of free amino acids in green coffee beans. I. Determination of amino acids after precolumn derivatization using 9-fluoromethylchloroformate.** Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung, 1994. **199**: p. 22-25.
 69. Pokorny, J., Côn, N.-H., Bulantová, H., Janicek, G., **Veränderungen von Aminosäuren und reduzierenden Zuckern während des Röstens von Kaffee.** Nahrung, 1974. **18**: p. 799-805.
 70. Guyot, B., Guelle, D., Assemet, S., Tchana, E., Pomathios, L., **Influence du mode de préparation du café vert robusta sur sa composition chimique et ses qualités organoleptiques.** in Seizième Colloque Scientifique International sur le Café. 1995. Kyoto, 9-14 avril 1995: ASIC, Paris.
 71. Eskes, A.B. und T. Leroy, **Coffee selection and breeding, in Coffee: Growing, processing, sustainable production**, J.N. Wintgens, Editor. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim. p. 57-86.
 72. Roberts, E.H., **Predicting the storage life of seeds.** Seed Science and Technology, 1973. **1**: p. 499-514.
 73. Ellis, R.H., T.D. Hong, und E.H. Roberts, **An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee.** Journal of Experimental Botany, 1990. **41**(230): p. 1167-1174.
 74. Ellis, R.H., T.D. Hong, und E.H. Roberts, **An intermediate category of seed storage behavior? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation tolerance in coffee.** Journal of Experimental Botany, 1991. **42**(238): p. 653-658.
 75. Bacchi, O., **Seca de semente de café ao sol.** Bragantia, 1955. **14**: p. 225-236.
 76. Huxley, P.A., **Investigations on the maintenance of viability of Robusta coffee seed in storage.** Proc. Int. Seed Test Ass. (Wageningen), 1964. **29**(3): p. 423-444.
 77. Wintgens, J.N., **The coffee plant**, in *Coffee: Growing, processing, sustainable production*, J.N. Wintgens, Editor. 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim. p. 3-24.
 78. Stirling, H. **Storage research on Kenya arabica coffee.** in Neuvième Colloque Scientifique International sur le Café. 1981. London, 16-20 juin 1980: ASIC, Paris.
 79. Vertucci, C.W. und E.E. Roos, **Theoretical basis of protocols for seed storage. II. The influence of temperature on optimal moisture levels.** Seed Science Research, 1993. **3**: p. 201-213.
 80. Dias, M.C.L. und W.R. da Silva, **The terazolium test for viability evaluation of coffee bean seed.** Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 1986. **21**(11): p. 1139-1145.
 81. da Silva, E.A.A., **Coffee (Coffea arabica cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation.** 2002: Wageningen, Netherlands.
 82. Downie, B., H.W.M. Hilhorst, und J.D. Bewley, **A new assay for quantifying endo- β -D-mannanase activity using Congo Red dye.** Phytochemistry, 1994. **36**(4): p. 829-835.
 83. Still, D.W., P. Dahal, und K.J. Bradford, **A single-seed assay for endo- β -mannanase activity from tomato endosperm and radicle tissues.** Plant Physiology, 1997. **113**: p. 13-20.

84. Wood, P.J., ***Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides***. Carbohydrate Research, 1980. **85**: p. 271-287.
85. Roth, M., ***Fluorescence reaction for amino acids***. Analytical Chemistry, 1971. **43**: p. 880-882.
86. Belitz, H.-D. und W. Grosch, ***Lehrbuch der Lebensmittelchemie***. 4 ed. 1992, Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo: Springer. p. 243
87. Laemmli, U.K., ***Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4***. Nature, 1970. **227**: p. 680-685.
88. Birnboim H.C., D.J., ***A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA***. Nucl Acids Res, 1979. **7**: p. 1513-1523.
89. Wormer, T.M., ***The growth of coffee berry***. Annals of Botany, 1964. **28**(109): p. 47-55.
90. Bewley, J.D. und M. Black, ***Seeds. Physiology of development and germination***. 2 ed. 1994, New York London: Plenum Press. p. 445.
91. Bino, R.J., Lanteri, S., Kraak, H.L., Verhoeven, H.A., ***Flow cytometric determination of nuclear replication stages in tomato seeds during priming and germination***. Annals of Botany, 1992. **69**: p. 231-236.
92. Lanteri, S., Saracco, F., Kraak, H.L., Bino, R.J., ***The effects of priming on nuclear replication activity and germination of pepper (Capsicum annuum) and tomato (Lycopersicon esculentum) seeds***. Seed Science Research, 1994. **4**: p. 81-87.
93. Sparvoli, E., Sgorbati, S., Levi, M., Brusa, P., ***Cytoanalytical investigations of the transition from quiescent cells (G₀) to actively proliferating cells (G₁) in germinating embryos of Pisum sativum***. Giorn. Bot. Ital., 1990. **124**: p. 805-812.
94. Van't Hof, J., ***Control points within the cell cycle***, in *The cell division cycle in plants*, J.A. Bryant und D. Francis, Editors. 1985, Cambridge University Press: Cambridge. p. 1-13.
95. Vázquez-Ramos, J.M. und M.d.I.P. Sánchez, ***The cell cycle and seed germination***. Seed Science Research, 2003. **13**(2): p. 113-130.
96. Bino, R.J., Lanteri, S., Verhoeven, H.A., Kraak, H.L., ***Flow cytometric determination of nuclear replication stages in seed tissues***. Annals of Botany, 1993. **72**: p. 181-187.
97. Clayton, L., ***The cytoskeleton and the cell cycle***, in *The cell division cycle in plants*, J.A. Bryant und D. Francis, Editors. 1985, Cambridge University Press: Cambridge. p. 113-132.
98. de Castro, R.D., Zheng, X., Bergervoet, J.H.W., Ric de Vos, C.H., Bino, R.J., ***β-Tubulin accumulation and DNA replication in imbibing tomato seeds***. Plant Physiology, 1995. **109**: p. 499-504.
99. Jing, H.-C., van Lammeren, A.A.M., de Castro, R.D., Bino, R.J., Hilhorst, H.W.M., Groot, S.P.C., ***β-Tubulin accumulation and DNA-synthesis are sequentially resumed in embryo organs of cucumber (Cucumis sativus L.) seeds during germination***. Protoplasma, 1999. **208**: p. 230-239.
100. de Castro, R.D., Estanislau, W.T., Carvalho, M.L. De, Hilhorst, H.W.M al., ***Functional development and maturation of coffee (Coffea arabica) fruits and seeds***. in *20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café*. 2005. Bangalore, India, Oct. 10-15: ASIC, Paris.
101. Breitenstein, B., Diplomarbeit (in Vorbereitung), Technische Universität Carolo Wilhelmina Braunschweig: Braunschweig.
102. Goldberg, R.B., S.J. Barker, und L. Perez-Grau, ***Regulation of gene expression during plant embryogenesis***. Cell, 1989. **56**: p. 149-160.

103. Selmar, D., Hunecke, D., Junghärtchen, I., Breitenstein, B., Bytof, G., Knopp, S.-E., **Expression of isocitrate lyase and the abundance of β -tubulin: Feasible markers for the estimation of germination processes in differently processed green coffees.** in *20^{ème} Colloque Scientifique International sur le Café*. 2005. Bangalore, India, Oct. 10-15 2004: ASIC, Paris.
104. Wallace, W., J. Secor, und L.E. Schrader, **Rapid accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation.** *Plant Physiology*, 1984. **75**: p. 170-175.
105. Kinnersley, A.M. und F.J. Turano, **Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress.** *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000. **19**(6): p. 479-509.
106. Breitzkreuz, K.E. und B.J. Shelp, **Subcellular compartmentation of the 4-aminobutyrate shunt in protoplasts from developing soybean cotyledons.** *Plant Physiology*, 1995. **108**: p. 99-103.
107. Bown, A.W. und B.J. Shelp, **The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid.** *Plant Physiology*, 1997. **115**: p. 1-5.
108. Müller, A., **Das Vorkommen von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) in *Coffea arabica* L.** 2005: Braunschweig.
109. López Garay, C., E. Bautista Romero, und M. Gonzáles. **Microflora of the stored coffee and its influence on quality.** in *Douzième Colloque Scientifique International sur le Café*. 1988. Montreux, 29 juin - 3 juillet 1987: ASIC, Paris.
110. Wintgens, J.N., ed. **Coffee: Growing, processing, sustainable production.** 2004, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA: Weinheim. p. 976.
111. Velasco, J.R. und J. Guitierrez, **Germination and its inhibition in coffee.** *Philippine Journal of Science*, 1974. **103**: p. 1-11.
112. Valio, I.F.M., **Germination of coffee seeds (*Coffea arabica* L. cv. *Mundo Novo*).** *Journal of Experimental Botany*, 1976. **27**: p. 983-991.
113. da Silva, E.A.A., Toorop, P.E., Nijse, J., Bewley, J.D., Hilhorst, H.W.M., **Supra-optimal GA concentrations inhibit coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination and lead to death of the embryo,** in *Coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination: mechanism and regulation*, E.A.A. da Silva, Editor. 2002, PhD Thesis: Wageningen, Netherlands. p. 41-57.
114. Rivas Vázquez, A. und A.R. Morillo, **Uso del tetrazolium en la determinación del poder germinativo de la semilla de café.** *Agronomía Tropical*, 1961. **14**(1): p. 5-12.
115. Gentil, D.F.O., **Coffee seed conservation: Discordant or complementary?** *Bragantia*, 2001. **60**(3).
116. Bradbury, A.G.W. und D.J. Halliday, **Chemical structure of green coffee bean polysaccharides.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990. **38**: p. 389-392.
117. Fischer, M., Reimann, S., Trovato, V., Redgwell, R.J., **Structural aspects of polysaccharides from Arabica coffee.** in *Dix-huitième Colloque Scientifique International sur le Café*. 1999. Helsinki 1999: ASIC, Paris.
118. Fischer, M., Reimann, S. Trovato, V., Redgwell, R.J., **Polysaccharides of green arabica and robusta coffee beans.** *Carbohydrate Research*, 2001. **330**: p. 93-101.

119. Cochrane, P.M., **Seed Carbohydrates**, in *Seed Technology and its Biological Basis*, M.a.B. Black, J.D., Editor. 2000, Sheffield academic press Ltd: Sheffield. p. 85 - 120.
120. Bewley, J.D., D.W.M. Leung, und F.B. Ouelette, **The cooperative role of endo- β -mannanase, β -mannosidase and α -galactosidase in the mobilization of endosperm cell wall hemicellulose of germinated lettuce seed**. Recent Advances in Phytochemistry, 1983. **17**: p. 137-152.
121. McCleary, B.V., **Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: The role of exo- β -mannanase**. Phytochemistry, 1983. **22**: p. 649-658.
122. Marraccini, P., Rogers, W.J., Allard, C., André, M.-L., Caillet, V., Lacoste, N., Lausanne, F., Michaux, S. I., **Molecular and biochemical characterization of endo- β -mannanases from germinating coffee (*Coffea arabica*) grains**. Planta, 2001. **213**: p. 296-308.
123. Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gübitz, G., Haltrich, D., **Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii***. Journal of Biotechnology, 2000. **80**: p. 127-134.
124. Roussos, S., Aquiahuatl, M.A., Trejo-Hernandez, M.R., Perraud, I.G., Favela, E., Ramakrishna, M., Raimbault, M., Vieniagra-Gonzalez, G., **Biotechnological management of coffee pulp-isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk**. Applied Microbiology and Biotechnology, 1995. **42**(5): p. 756-762.
125. Vincent, J.-C., **Green coffee processing**, in *Technology*, R.J. Clarke und R. Macrae, Editors. 1987, Elsevier: London, New York. p. 1-33.
126. da Silva, E.A.A., **General introduction. Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation**, in *Coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination: mechanism and regulation*, E.A.A. da Silva, Editor. 2002, PhD Thesis: Wageningen, Netherlands. p. 1-6.
127. McCleary, B.V. und N.K. Matheson, **α -D-Galactosidase activity and galactomannan and galactosucrose oligosaccharide depletion in germinating legume seeds**. Phytochemistry, 1974. **13**: p. 1747-1757.
128. Seiler, A., **Galactomannan breakdown in germinating Carob seeds (*Ceratonia siliqua* L.)**. Planta, 1977. **134**: p. 209-221.
129. Petek, F. und T. Dong, **Séparation et étude de deux α -galactosidases des graines du café**. Enzymologia, 1961. **23**: p. 133-142.
130. Harpaz, N., H.M. Flowers, und N. Sharon, **Purification of coffee bean α -galactosidase by affinity chromatography**. Biochimica et Biophysica Acta, 1974. **341**: p. 213-221.
131. Zhu, A. und J. Goldstein, **Cloning and functional expression of DNA encoding coffee bean α -galactosidase**. Gene, 1994. **140**: p. 227-231.
132. Ludwig, E., Lipke, U., Raczek, U., Jäger, A., **Investigations of peptides and proteases in green coffee beans**. European Food Research and Technology, 2000. **211**: p. 111-116.
133. Macrae, R., **Nitrogenous components**, in *Coffee: Chemistry*, R.J. Clarke und R. Macrae, Editors. 1985, Elsevier: London New York. p. 115-152.
134. Ginz, M., Balzer, H.H., Bradbury, A.G.W., Maier, H.G., **Formation of aliphatic acids by carbohydrate degradation during roasting of coffee**. European Food Research and Technology, 2000. **211**(6): p. 404-410.
135. Stewart, G.R. und F. Larher, **Accumulation of amino acids and related compounds in relation to environmental stress**, in *The Biochemistry of*

- Plants*, B.J. Mifflin, Editor. 1980, Academic Press: New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco. p. 609-635.
136. Guyot, B., Gueule, D., Manez, J.C., Perriot, J.J., Giron, J., Villain, L., ***Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés Arabica***. Plantations, Recherche, Développement, 1996. **3**(4): p. 272-280.
 137. Bradbury, A.G.W. und D.J. Halliday. ***Polysaccharides in green coffee beans***. in *Douzième Colloque Scientifique International sur le Café*. 1988. Montreux, 29 juin - 3 juillet 1987: ASIC, Paris.
 138. Monteze Guimarães, V., Tavares de Rezende, S., Alves Moreira, M., Gonçalves de Barros, E., Felix, C.R., ***Characterization of α -galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides***. Phytochemistry, 2001. **58**: p. 67-73.
 139. Herold, A. und D.H. Lewis, ***Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate***. New Phytologist, 1977. **79**: p. 1-40.
 140. Meier, H. und J.S.G. Reid, ***Reserve polysaccharides other than starch in higher plants***, in *Encyclopedia of plant physiology. Plant Carbohydrates I. Intracellular carbohydrates*, F.A. Loewus und W. Tanner, Editors. 1982, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg New York. p. 418-471.
 141. Stenlid, G., ***Toxic effects of D-mannose, 2-deoxy-D-glucose und D-glucosamine upon respiration and ion absorption in wheat roots***. Physiologia Plantarum, 1954. **7**: p. 173-181.
 142. Morgan, D.R. und H.E. Street, ***The carbohydrate nutrition of tomato roots. VII. Sugars, sugar phosphates and sugar alcohols as respiratory substrates for excised roots***. Annals of Botany, 1959. **23**: p. 89-105.
 143. Goldsworthy, A. und H.E. Street, ***The carbohydrate nutrition of tomato roots VIII: the mechanism of the inhibition by D-mannose of the respiration of excised roots***. Annals of Botany, 1965. **29**: p. 45-50.
 144. Jang, J.C. und J. Sheen, ***Sugar sensing in higher plants***. Plant Cell, 1994. **6**: p. 1665-1679.
 145. Graham, L.A., Liou, Y.-C., Walker, V.K., Davies, P.L., ***Role of CED-4 in the activation of CED-3***. Nature, 1997. **388**: p. 728-729.
 146. Avelino, J., Barboza, B., Araya, J.C., Fonseca, C., Davrieux, F., Guyot, B., Cilas, C., ***Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa María de Dota***. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**(11): p. 1869-1876.
 147. Ky, C.L., Barre, P., Lorieux, M., Trouslot, P., Akaffou, S., Louarn, J., Charrier, A., Hamon, Noirot, M., ***Interspecific genetic linkage map. segregation distortion and genetic conversion in coffee (Coffea sp.)***. Theoretical and Applied Genetic, 2000. **101**: p. 669-676.
 148. Rolz, C., Menchù, J.F., Espinosa, R., Garcia-Prendes. A., ***Coffee fermentation studies***. in *Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés*. 1973. Lisbonne, 14-19 juin 1971: ASIC, Paris.
 149. Roberts, J.K.M., Callis, J., Wemmer, D., Walbot, V., Jaretsky, O., ***Mechanism of cytoplasmic pH regulation in hypoxic maize root tips and its role in survival under hypoxia***. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984. **81**: p. 3379-3383.
 150. Wootton, A.E. ***The dry matter loss from parchment coffee during field processing***, in *Cinquième Colloque International sur la Chimie des Cafés*

- Verts, Torréfiés et leurs Dérivés*. 1973. Lisbonne, 14-19 juin 1971: ASIC, Paris.
151. Simon, E.W. und L.K. Mills, ***Imbibition, Leakage and Membranes, in Mobilization of reserves in germination***, in Mobilization of reserves in germination, 1983. Plenum Press: New York London. p. 9-27.
 152. Spyropoulos, C.G. und M.P. Lambiris, ***Effect of water stress on germination and reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of Ceratonia siliqua L.*** Journal of Experimental Botany, 1980. **31**: p. 851-857.
 153. Tressl, R., Wondrak, G.T., Garbe, L.-A., Rewicki, D., Krüger, R.-P., ***Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers.*** Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998. **46**: p. 1765-1776.

Abbildungsverzeichnis:

ABB. 1:	KAFFEEAUFBEREITUNGSVARIATIONEN AUF DEN <i>FAZENDAS CONQUISTA</i> UND <i>CAPOERINHA</i> DER <i>IPANEMA AGRICOLA LMTD.</i> IN ALFENAS, BRASILIEN.	14
ABB. 2:	N-GLYKOSIDBILDUNG ÜBER ADDITION AN DIE CARBONYLGRUPPE MIT ANSCHLIEßENDER WASSERABSPALTUNG ZUM IMIN UND CYCLISIERUNG ZUM GLYKOSYLAMIN (VERÄNDERT NACH BELITZ UND GROSCH[32]).	18
ABB. 3:	AMADORI- UND HEYNS-UMLAGERUNG VON GLUCOSYLAMINEN (VERÄNDERT NACH BELITZ UND GROSCH [32]).	18
ABB. 4:	BILDUNG VON A-DICARBONYLVERBINDUNGEN AM BEISPIEL EINES 3-DESOXYOSONES AUS EINER 1-AMINO-1-DESOXYKETOSE (VERÄNDERT NACH BELITZ UND GROSCH [32]). STATT DER HIER DARGESTELLTEN 1,2-ENOLISIERUNG KANN EBENSO EINE 2-3 ENOLISIERUNG STATTFINDEN, WELCHE ANALOG ZUM 1-DESOXYOSON FÜHRT.	19
ABB. 5:	BILDUNG VON AROMARELEVANTEN (<i>STRECKER</i> -) ALDEHYDEN UND AMINOKETONEN ÜBER DEN <i>STRECKER</i> -ABBAU (VERÄNDERT NACH BELITZ UND GROSCH [32]).	19
ABB. 6:	KAFFEEFELDER DER <i>IPANEMA AGRICOLA INDUSTRIA LMTD.</i>	22
ABB. 7:	ERLENMEYERKOLBEN MIT ENTPULPTEN KAFFEEBOHNEN WÄHREND EINER NASSEN LABORAUFBEREITUNG.	23
ABB. 8:	IN <i>LAVADORES</i> WERDEN ALLE SCHWIMMENDEN FREMDSTOFFE UND KAFFEEKIRSCHEN (<i>FLOATERS</i>) ABGETRENNT.	24
ABB. 9:	IN PULPERN WERDEN NUR VOLLREIFE ROTE FRÜCHTE ENTSCHLEIMT.	25
ABB. 10:	TROCKNUNG BEI DEN MUSTERAUFBEREITUNGEN AUF DEM <i>PATIO</i> DER <i>IPANEMA</i>	25
ABB. 11:	KOMBINIERTE ADSORPTIONS- UND DESORPTIONSISOTHERME VON ROHKAFFEE (VERÄNDERT NACH STIRLING [78]).	27
ABB. 12:	LAGERUNG DER ROHKAFFEEPROBEN IN GESCHLOSSENEN GLASAQUARIEN ÜBER GESÄTTIGTER AMMONIUMNITRAT-LÖSUNG.	28
ABB. 13:	VERKOSTUNG AUF DER DER <i>IPANEMA AGRICOLA INDUSTRIA LMTD.</i>	29
ABB. 14:	NACHWEISREAKTION AUF VITALE ZELLEN IN PFLANZENGEWEBE MIT TRIPHENYLTETRAZOLIUMCHLORID (TTC).	30
ABB. 15:	ABBILDUNGEN EINES SAMEN MIT VITALEM EMBRYO UND ENDOSPERM (LINKS) UND EINES SAMEN IN DEM BEIDE TEILE BEREITS ABGESTORBEN SIND UND BEIM TTC-TEST NICHT MEHR ROT ANGEFÄRBT WERDEN (RECHTS).	30
ABB. 16:	CHROMATOGRAMM EINES ZUCKER-MISCHSTANDARDS.	37
ABB. 17:	CHROMATOGRAMM EINER UNVERDÜNNTEN FRISCHEN ROHKAFFEEPROBE (<i>COFFEA ARBICA</i> L. VAR. <i>ACAIÁ</i> , MEXIKO).	37
ABB. 18:	DARSTELLUNG DER SCHICHTEN DES PAGE-SANDWICHS.	40
ABB. 19:	VERWENDETES ICL-FRAGMENT. UNTERSTRICHEN SIND DIE FORWARD UND REVERSE PRIMER-BINDUNGSSTELLEN.	43
ABB. 20:	INTERNER STANDARD FÜR DIE PCR. MIT ROTEN BUCHSTABEN IST DAS INSERT GEKENNZEICHNET, DAS AUS PBR322 STAMMT. DIE ALS REVERSE PRIMER BINDUNGSSTELLE GEKENNZEICHNETE SEQUENZ ENTSPRICHT DEM PRIMER, DER FÜR DIE RT-PCR-ANALYSEN VERWENDET WURDE. DA DIE RT-REAKTION MIT EINEM SPEZIFISCHEN RT-PRIMER DURCHGEFÜHRT WURDE (BLAU UNTERLEGTER KASTEN) UND DIE TAQ-POLYMERASE EINEN ÜBERHANG VON EINIGEN BASENPAAREN BENÖTIGT, MUSSTE DER URSPRÜNGLICHE REVERSE PRIMER DURCH EIN IN DER SEQUENZ ETWAS WEITER VORNE LIEGENDES STÜCK ERSETZT WERDEN (GESCHWUNGENE KLAMMER).	44
ABB. 21:	BEISPIEL EINES GELS EINER RT-PCR VON ICL-TRANSKRIPTEN IN NASS AUFBEREITETEN ROHKAFFEEBOHNEN.	50
ABB. 22:	BEISPIEL EINES GELS EINER RT-PCR VON ICL-TRANSKRIPTEN IN TROCKEN AUFBEREITETEN ROHKAFFEEBOHNEN.	50
ABB. 23:	UNSORTIERTE KIRSCHEN NACH MASCHINELLER ERNTE.	52
ABB. 24:	UNSORTIERTE (LINKS) SOWIE AUSSORTIERTE ÜBERREIFE SCHWARZE UND FÜR DIE TROCKENE AUFBEREITUNG VERWENDETE VOLLREIFE ROTE KIRSCHEN.	52
ABB. 25:	DARSTELLUNG DES ZELLZYKLUS (MIT DEN SOGENANNTEN 4C- UND 2C-PHASEN).	54
ABB. 26:	VERÄNDERUNGEN DES PROZENTUALEN GEHALTES AN VERDOPPELTEN ZELLKERNEN, D.H. SOLCHEN KERNEN, DIE BEREITS DEN DOPPELTEN CHROMOSOMENSATZ BESITZEN, SICH ABER NOCH NICHT GETEILT HABEN (4C-	

	NUCLEI). JEDER MESSWERT REPRÄSENTIERT EINE MISCHPROBE AUS 10 FRISCHEN EMBRYOS.....	55
ABB. 27:	WESTERN BLOT ANALYSEN VON EMBRYOS, WELCHE AUS NASS UND TROCKEN AUFBEREITETEN KAFFEEBOHNEN WÄHREND DER AUFBEREITUNG HERAUSPRÄPARIERT WURDEN, IM VERGLEICH MIT EMBRYOS AUS BOHNEN FRISCHER KAFFEE-KIRSCHEN (FERMENTATION BEI DER NASSEN AUFBEREITUNG HIER 18 H).....	57
ABB. 28:	RELATIVE GEHALTE AN B-TUBULIN IN KAFFEESAMEN (<i>COFFEA ARABICA</i> L.) WÄHREND NASSER AUFBEREITUNG.....	58
ABB. 29:	RELATIVE GEHALTE AN B-TUBULIN IN KAFFEESAMEN (<i>COFFEA ARABICA</i> L.) WÄHREND TROCKENER AUFBEREITUNG.....	58
ABB. 30:	ENTWICKLUNG DER ICL-TRANSKRIPTMENGE WÄHREND TROCKENER AUFBEREITUNG. BEI DIESER ANALYSENREihe WURDEN SAMEN AUS DEM BOTANISCHEN GARTEN, WITZENHAUSEN VERWENDET. WIEDERUM WURDEN SOWOHL FRISCHE WIE AUCH PARALLEL NASS UND TROCKEN AUFBEREITETE SAMEN FÜR DIE ANALYSEN EINGESETZT.....	61
ABB. 31:	ENTWICKLUNG DER ICL-TRANSKRIPTMENGE WÄHREND NASSER AUFBEREITUNG. DIE BOHNEN SIND IN DIESER ART DER AUFBEREITUNG BEREITS NACH VIER TAGEN „KNOCHENTROCKEN“, D.H. SIE ERREICHEN DAS LEVEL DER FÜR KAFFEESAMEN ÜBLICHEN 10 BIS 12 % RESTFEUCHTE. EIN SICH ANSCHLIEßENDER WEITERER ABFALL IST BEI DIESEN INSTABILEN RNA-TRANSKRIPTEN WAHRSCHEINLICH UND WIRD DURCH DAS DOKUMENTIERTE ABSINKEN NACH SECHS TAGEN UNTERMAUERT.....	61
ABB. 32:	ANSTIEG DES GABA-GEHALTES WÄHREND FORTSCHREITENDER TROCKNUNG (TROCKENE LABORAUFBEREITUNG, TROCKNUNGSTEMPERATUR 40°C, 12 H TÄGLICH).....	64
ABB. 33:	GABA-GEHALTE WÄHREND EINER NASSEN AUFBEREITUNG (NASSE LABORAUFBEREITUNG, FERMENTATION IN 10 CM SCHICHTHÖHE, WASSERWECHSEL ETWA ALLE 12 H, ANSCHLIEßENDE TROCKNUNGSTEMPERATUR 40°C, 12 H TÄGLICH).....	64
ABB. 34:	GABA-GEHALTE IN BLÄTTERN EINES KAFFEEBAUMES (<i>COFFEA ARABICA</i> L.) AUS DEN RÄUMEN DES INSTITUTS FÜR PFLANZENBIOLOGIE.....	65
ABB. 35:	ERGEBNISSE DER VITALITÄTSTESTS WÄHREND DER LAGERUNG VON ROHKAFFEE.....	69
ABB. 36:	GEL-DIFFUSIONSTEST ZUR BESTIMMUNG DER ENDO- β -MANNANASE-AKTIVITÄT IN GEQUOLLENEN KAFFEEKEIMLINGEN UND IN KAFFEESÄMLINGEN. EXTRAKTE WURDEN AUS FRISCHEN KAFFEE-KEIMLINGEN UND -SÄMLINGEN HERGESTELLT. ALS BLINDPROBE WURDE DER REINE PUFFER EINGESETZT. PROBENSCHLÜSSEL SIEHE TAB. 11.....	72
ABB. 37:	GEL-DIFFUSIONSTEST ZUR BESTIMMUNG DER ENDO- β -MANNANASE-AKTIVITÄT IN UNGELAGERTEN ROHKAFFEEPROBEN. ENZYM-EXTRAKTE WURDEN AUS DEN UNGELAGERTEN BRASIL-PROBEN („0 MONATE“) HERGESTELLT. ALS BLINDPROBE WURDE DER REINE PUFFER EINGESETZT. PROBENSCHLÜSSEL SIEHE TAB. 12.....	73
ABB. 38:	B-MANNOSIDASEAKTIVITÄT VON TROCKEN AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	75
ABB. 39:	B-MANNOSIDASEAKTIVITÄT VON SEMI-DRY AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	75
ABB. 40:	B-MANNOSIDASEAKTIVITÄT VON NASS AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	75
ABB. 41:	B-MANNOSIDASEAKTIVITÄT VON NASS AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE, DER IM PARCHMENT GELAGERT WURDE, WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	76
ABB. 42:	A-GALACTOSIDASEAKTIVITÄT VON TROCKEN AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	77
ABB. 43:	A-GALACTOSIDASEAKTIVITÄT VON SEMI-DRY AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	77
ABB. 44:	A-GALACTOSIDASEAKTIVITÄT VON NASS AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	77
ABB. 45:	A-GALACTOSIDASEAKTIVITÄT VON NASS AUFBEREITETEM BRASIL-KAFFEE, DER IM PARCHMENT GELAGERT WURDE, WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG.....	78

ABB. 46:	ENTWICKLUNG DER GESAMTAMINOSÄUREGEHALTE VON ROHKAFFEEBOHNEN VON PARALLEL NASS UND TROCKEN AUFBEREITETEN ARABICA ROHKAFFEES WÄHREND DER JEWEILIGEN AUFBEREITUNG MIT UND OHNE BERÜCKSICHTIGUNG DER NICHTPROTEINOGENEN AMINOSÄURE GABA.	80
ABB. 47:	ENTWICKLUNG DER GEHALTE VON GLUTAMINSÄURE, ALANIN, SERIN, ASPARAGIN UND LEUCIN WÄHREND TROCKENER LABORAUFBEREITUNG IN ARABICA KAFFEESAMEN (<i>COFFEA ARABICA</i> L.).....	81
ABB. 48:	ENTWICKLUNG DER GEHALTE VON GLUTAMINSÄURE, ALANIN, SERIN, ASPARAGIN UND LEUCIN WÄHREND TROCKENER LABORAUFBEREITUNG IN ARABICA KAFFEESAMEN (<i>COFFEA ARABICA</i> L.).....	82
ABB. 49:	VERÄNDERUNG DER GESAMTAMINOSÄUREGEHALTE WÄHREND EINER ZWEIJÄHRIGEN LAGERUNG VON ROHKAFFEE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER AUFBEREITUNGSMETHODE MIT UND OHNE BERÜCKSICHTIGUNG DER NICHT PROTEINOGENEN AMINOSÄURE GABA; ZUSÄTZLICH WIRD UNTERSCHIEDEN, OB DER NASS AUFBEREITETE KAFFEE GESCHÄLT ODER NOCH IN DER HORNSCHALE GELAGERT WURDE.	83
ABB. 50:	VERÄNDERUNG DER ALANIN- UND SERIN-GEHALTE WÄHREND EINER ZWEIJÄHRIGEN LAGERUNG VON ROHKAFFEE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER AUFBEREITUNGSMETHODE; ZUSÄTZLICH WIRD UNTERSCHIEDEN, OB DER NASS AUFBEREITETE KAFFEE GESCHÄLT ODER NOCH IN DER HORNSCHALE GELAGERT WURDE (PERGAMINO).	84
ABB. 51:	VERÄNDERUNG DER GLUTAMIN- UND LEUCIN-GEHALTE WÄHREND EINER ZWEIJÄHRIGEN LAGERUNG VON ROHKAFFEE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER AUFBEREITUNGSMETHODE; ZUSÄTZLICH WIRD UNTERSCHIEDEN, OB DER NASS AUFBEREITETE KAFFEE GESCHÄLT ODER NOCH IN DER HORNSCHALE GELAGERT WURDE (PERGAMINO).	84
ABB. 52:	TYPISCHE VERTEILUNG DER ZUCKER EINES TROCKEN AUFBEREITETEN ARABICA ROHKAFFEES AUS BRASILILIEN (<i>COFFEA ARABICA</i> VAR. <i>ACAIÁ</i>).	86
ABB. 53:	SACCHAROSE-GEHALTE VON ZWEI ROHKAFFEES UNTERSCHIEDLICHER HERKUNFT JEWEILS VOR UND NACH DEN UNTERSCHIEDLICHEN LABORAUFBEREITUNGEN. ..	88
ABB. 54:	GEHALTE VON GLUCOSE UND FRUCTOSE IN ZWEI ARABICA-ROHKAFFEES JEWEILS VOR UND NACH TROCKENER BZW. NASSER (LABOR-) AUFBEREITUNG.	89
ABB. 55:	GEHALTE VON RAFFINOSE UND STACHYOSE IN ZWEI ARABICA-ROHKAFFEES JEWEILS VOR UND NACH TROCKENER UND NASSER (LABOR-) AUFBEREITUNG.	91
ABB. 56:	GEHALTE VON GALACTOSE IN ZWEI ARABICA-ROHKAFFEES JEWEILS VOR UND NACH TROCKENER UND NASSER (LABOR-) AUFBEREITUNG.	92
ABB. 57:	GEHALTE VON RHAMNOSE UND ARABINOSE IN ZWEI ARABICA-ROHKAFFEES JEWEILS VOR UND NACH TROCKENER UND NASSER (LABOR-) AUFBEREITUNG.	93
ABB. 58:	GEHALTE VON MANNOSE IN ZWEI ARABICA-ROHKAFFEES JEWEILS VOR UND NACH TROCKENER UND NASSER (LABOR-) AUFBEREITUNG.	94
ABB. 59:	DARSTELLUNG DER GLUCOSE-GEHALTE IN DEN VERSCHIEDEN AUFBEREITETEN ROHKAFFEES AUS DEN BRASILIANISCHEN FELDVERSUCHEN, ZUM ZEITPUNKT, ALS SIE IN BRAUNSCHWEIG EINGELAGERT WURDEN (1 MONATSWERTE).	97
ABB. 60:	VERÄNDERUNGEN DES GLUCOSE-GEHALTES VON NASS (W UND P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAPITEL 2.3) (ZEITACHSE NICHT LINEAR). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN AUSGANGSMATERIALS.	98
ABB. 61:	VERÄNDERUNGEN DES FRUCTOSE-GEHALTES VON NASS (W UND P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAPITEL 2.3). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN AUSGANGSMATERIALS.	99
ABB. 62:	VERÄNDERUNGEN DES FRUCTOSE-GEHALTES VON NASS (W+P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAP. 2.3) (ZEITACHSE NICHT LINEAR). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN AUSGANGSMATERIALS.	99

ABB. 63:	VERÄNDERUNGEN DES GALACTOSE-GEHALTES VON NASS (W+P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAPITEL 2.3) (ZEITACHSE NICHT LINEAR). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN PROBENMATERIALS.	100
ABB. 64:	VERÄNDERUNGEN DES ARABINOSE-GEHALTES VON NASS (W+P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAP. 2.3) (ZEITACHSE NICHT LINEAR). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN PROBENMATERIALS.	101
ABB. 65:	VERÄNDERUNGEN DES RHAMNOSE-GEHALTES VON NASS (W+P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAPITEL. 2.3) (ZEITACHSE NICHT LINEAR). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN PROBENMATERIALS.	102
ABB. 66:	VERÄNDERUNGEN DES SACCHAROSE-GEHALTES VON NASS (W+P), TROCKEN (D) UND SEMI-DRY (S) AUFGEARBEITETEN ROHKAFFEE-BOHNEN WÄHREND ZWEIJÄHRIGER LAGERUNG UNTER DEFINIERTEN BEDINGUNGEN (SIEHE KAP. 2.3) (ZEITACHSE NICHT LINEAR). DIE RÖMISCHE ZAHL MARKIERT JEWEILS DIE ZUGEHÖRIGKEIT ZU EINER DER DREI CHARGEN IDENTISCHEN AUSGANGSMATERIALS.	103
ABB. 67:	VERKOSTUNGSERGEBNISSE DURCH DIE PROFESSIONELLEN VERKOSTER DER <i>IPANEMA</i> IN BRASILien DIREKT NACH ENDE DER AUFBEREITUNGEN.	104
ABB. 68:	KALIBRIERFUNKTION VON ARABINOSE	128
ABB. 69:	KALIBRIERFUNKTION VON FRUCTOSE	128
ABB. 70:	KALIBRIERFUNKTION VON GALACTOSE	129
ABB. 71:	KALIBRIERFUNKTION VON GLUCOSE	129
ABB. 72:	KALIBRIERFUNKTION VON MANNOSE	130
ABB. 73:	KALIBRIERFUNKTION VON MELEZITOSE	130
ABB. 74:	KALIBRIERFUNKTION VON RAFFINOSE	131
ABB. 75:	KALIBRIERFUNKTION VON RHAMNOSE	131
ABB. 76:	KALIBRIERFUNKTION VON SACCHAROSE	132
ABB. 77:	KALIBRIERFUNKTION VON STACHYOSE	132

6. Anhang

Die Kalibrierfunktionen zeigen Korrelationskoeffizienten zwischen 99,8032 (Fructose) und 99,9907 (Galactose). Lediglich bei Saccharose (98,1169) und Mannose (97,0371) weichen sie etwas von diesen guten Werten ab. Die relative Standard-Abweichung lag zwischen 1,37 % bei Glucose und 4,82 % bei Saccharose. Die Bestimmung der Mannose leidet unter der Nähe zur Saccharose, weshalb die Standardabweichung bei diesem Zucker bei etwa 10 % liegt. In Kaffeeproben lagen die prozentualen relativen Standardabweichungen in der Regel unterhalb von 10 %. Die für die Zucker ermittelten Nachweisgrenzen betrugen:

Tabelle 19: Nachweisgrenzen der Zucker:

Zucker	pmol/20µl
Rhamnose	1,3
Arabinose	1,1
Galactose	3,2
Glucose	1,0
Mannose	2,0
Saccharose	1,0
Fructose	4,6
Melezitose	1,8
Raffinose	1,8
Stachyose	1,0

Die Bestimmungsgrenzen lagen entsprechend um ein 5-faches höher.

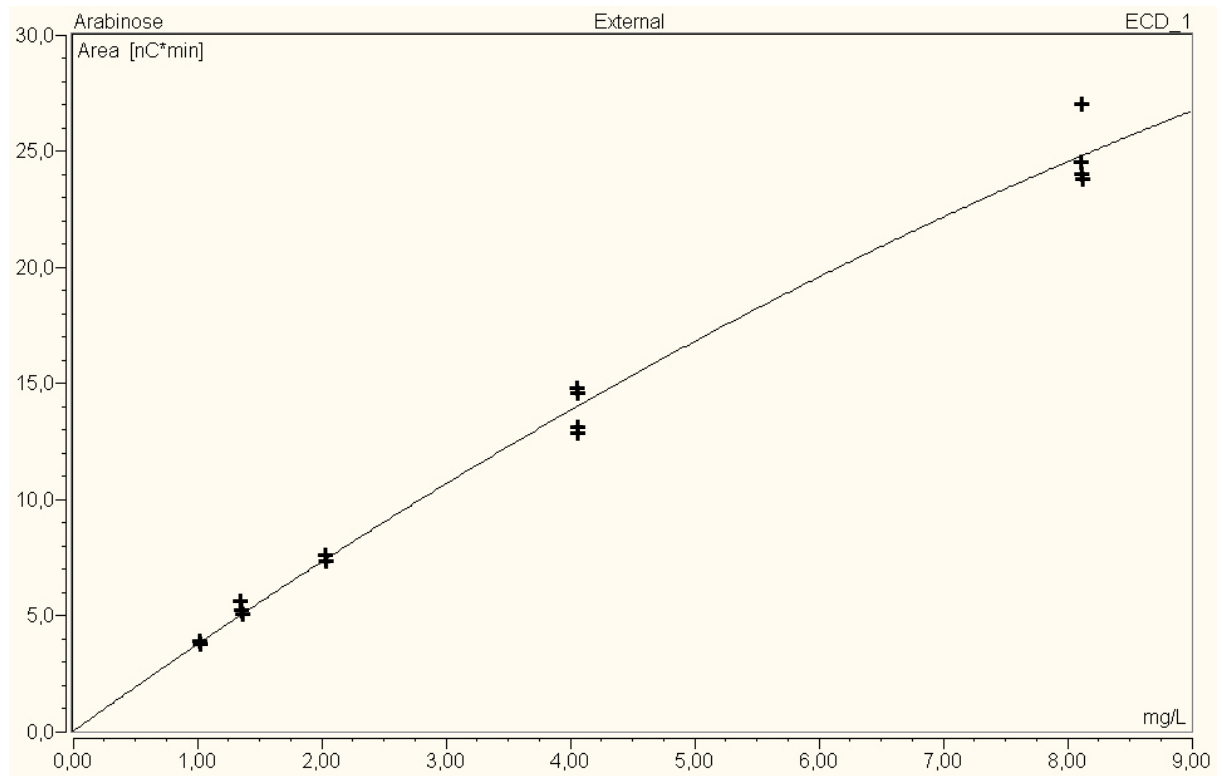


Abb. 68: Kalibrierfunktion von Arabinose

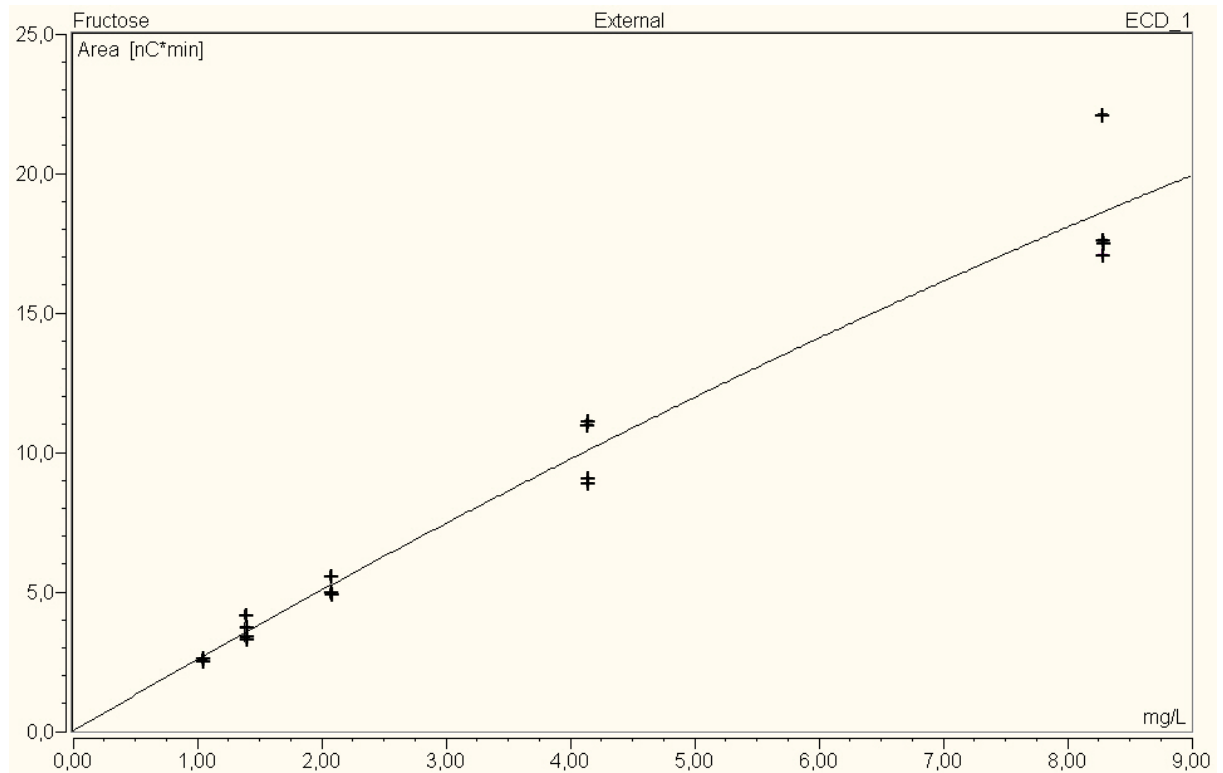


Abb. 69: Kalibrierfunktion von Fructose

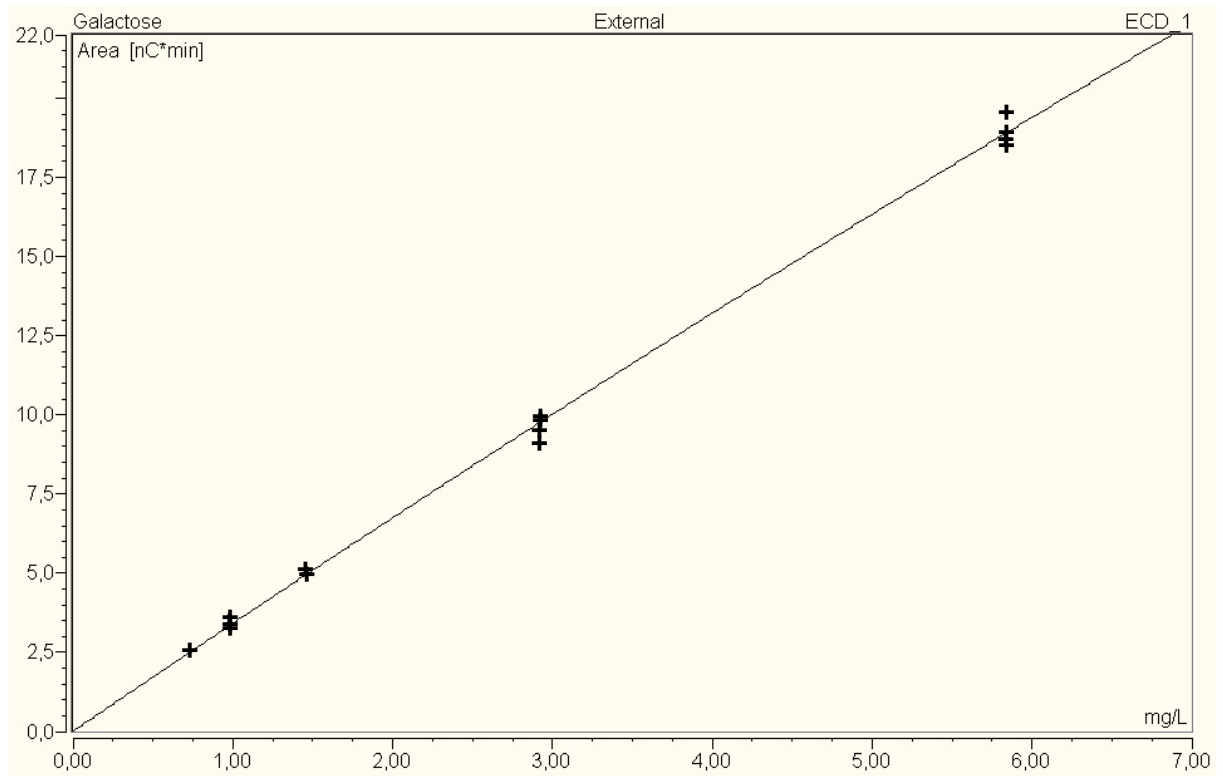


Abb. 70: Kalibrierfunktion von Galactose

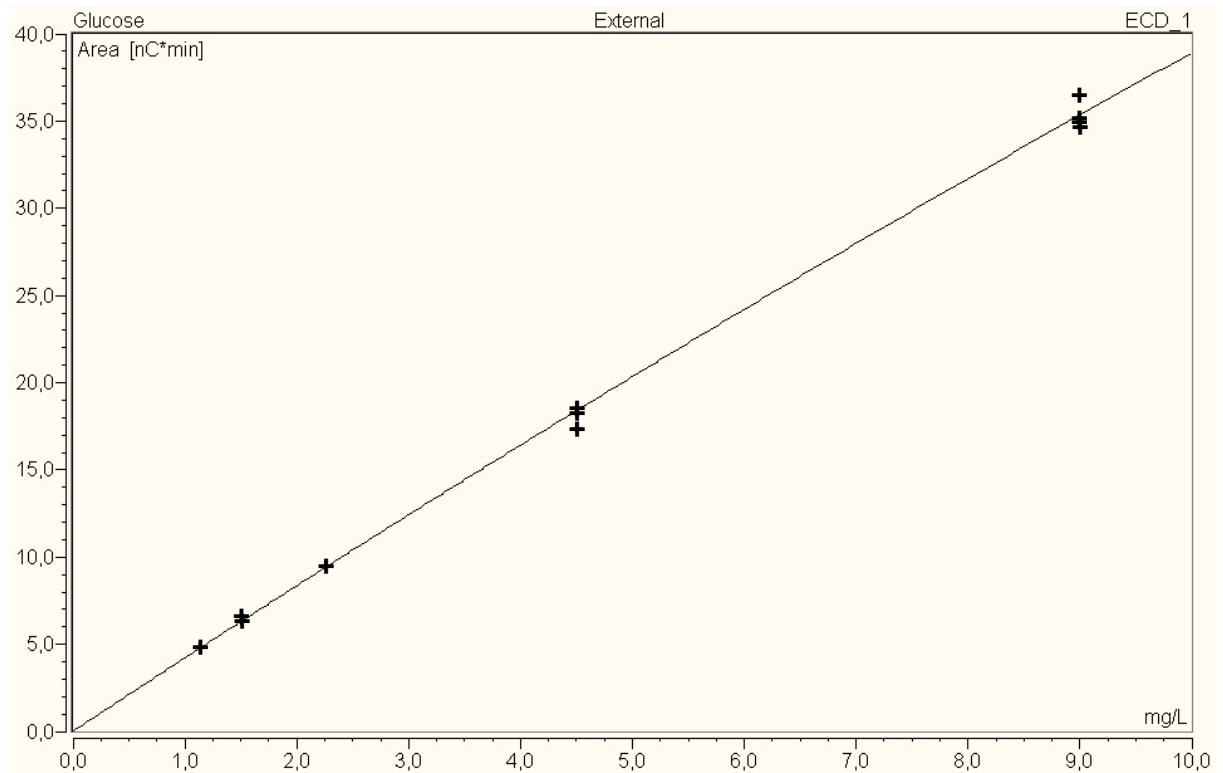


Abb. 71: Kalibrierfunktion von Glucose

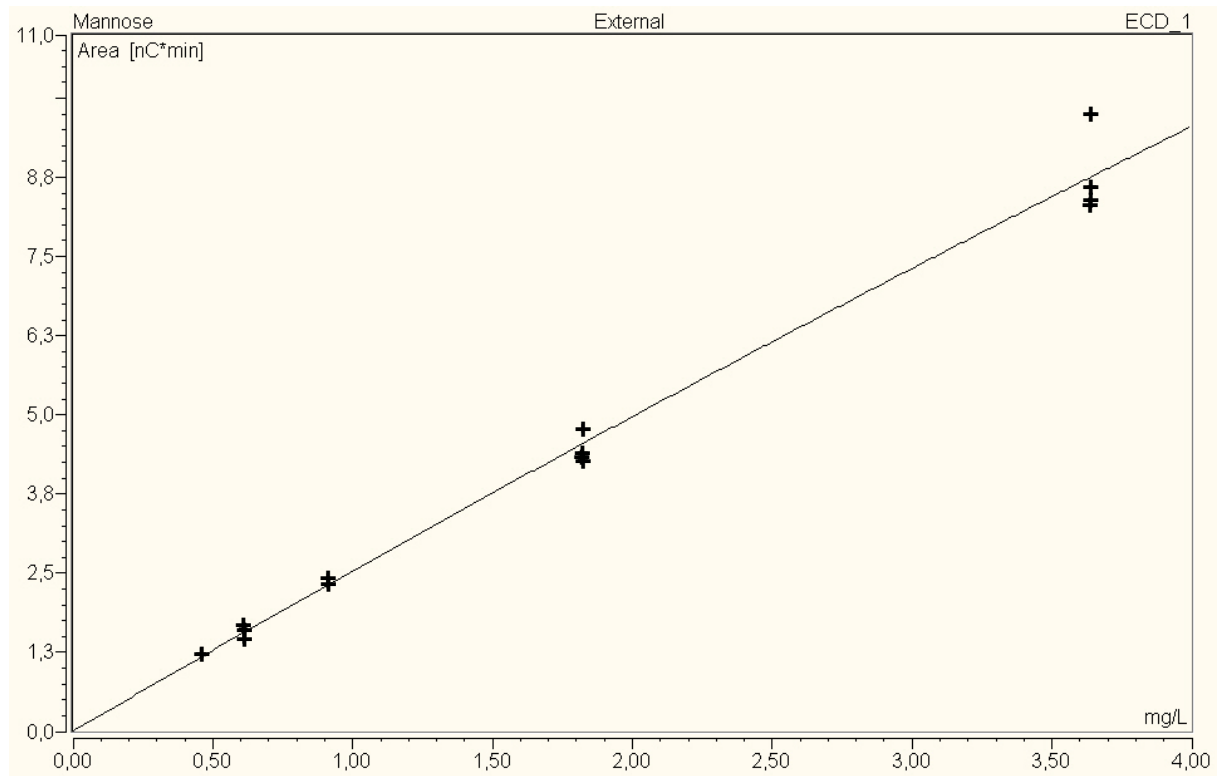


Abb. 72: Kalibrierfunktion von Mannose

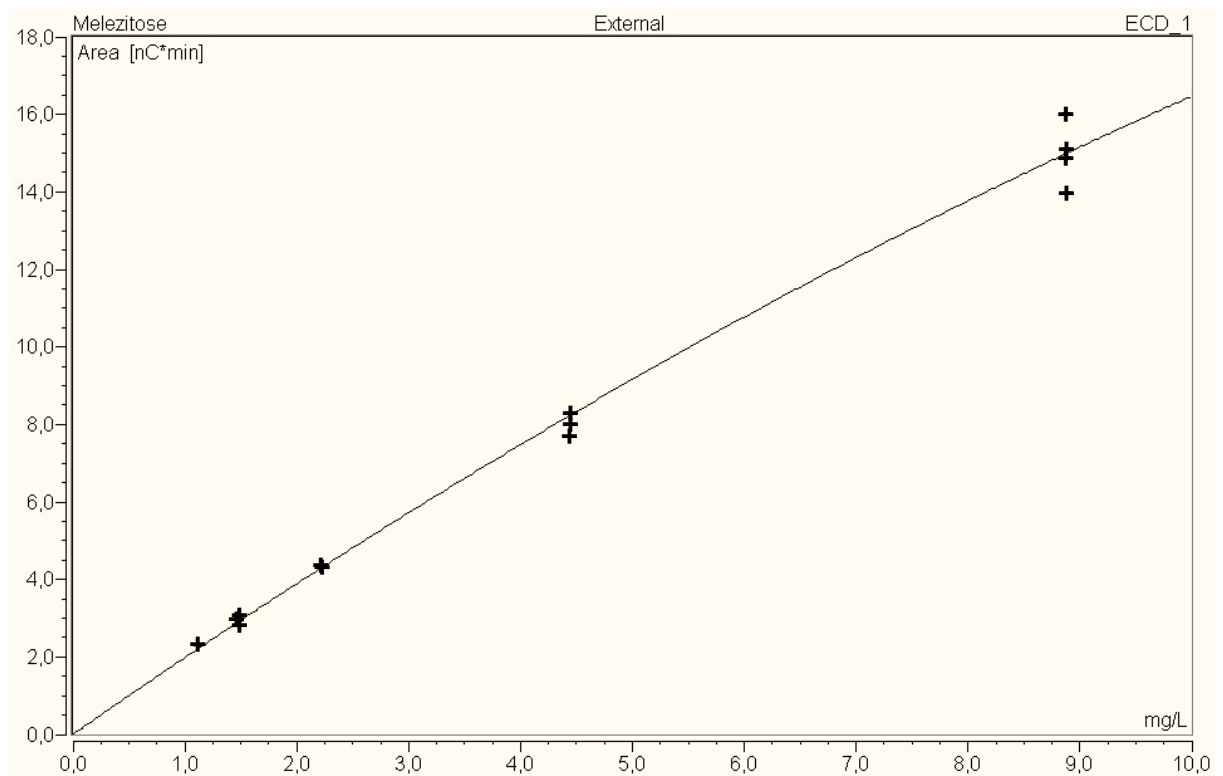


Abb. 73: Kalibrierfunktion von Melezitose

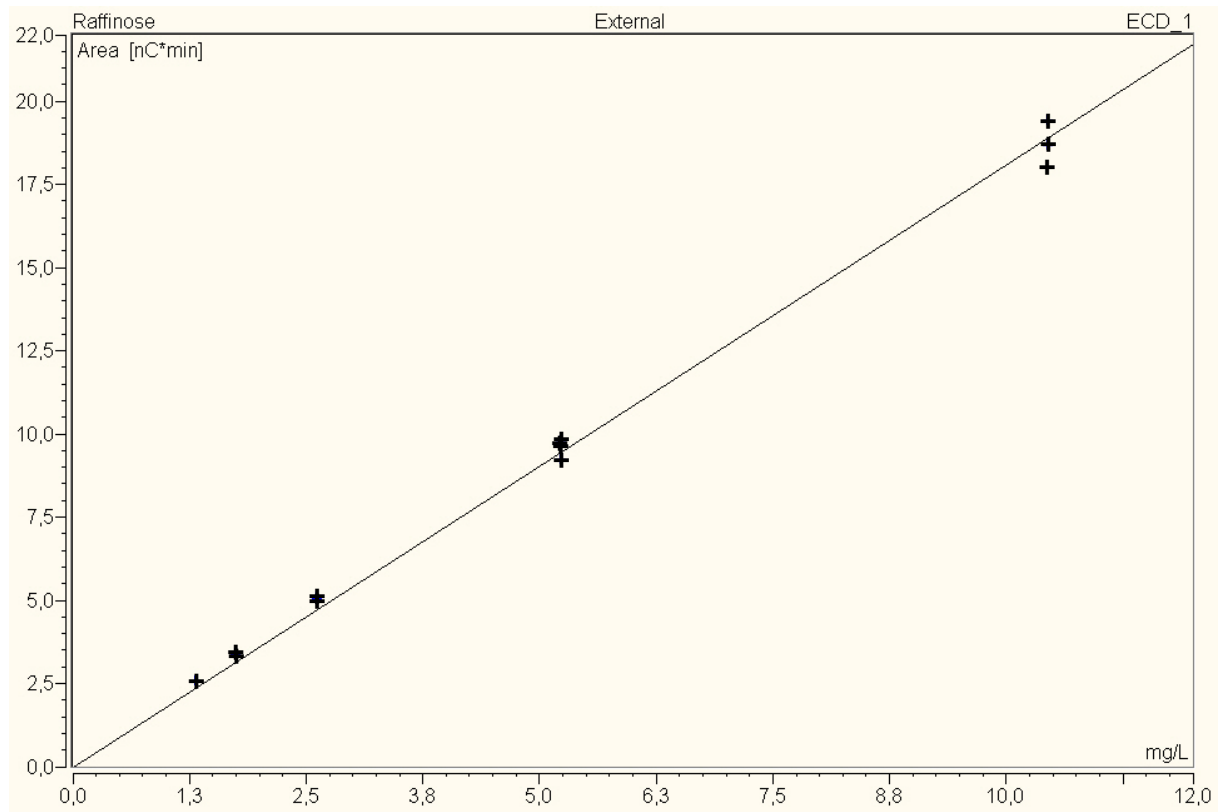


Abb. 74: Kalibrierfunktion von Raffinose

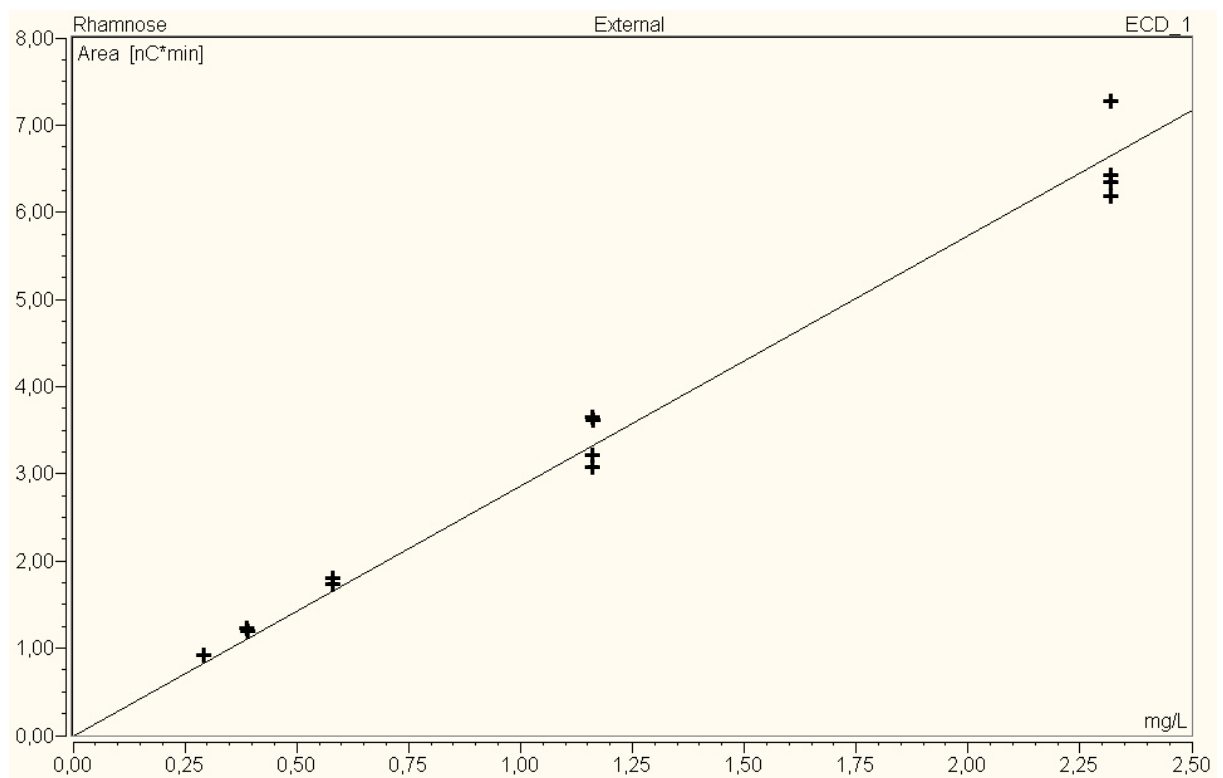


Abb. 75: Kalibrierfunktion von Rhamnose

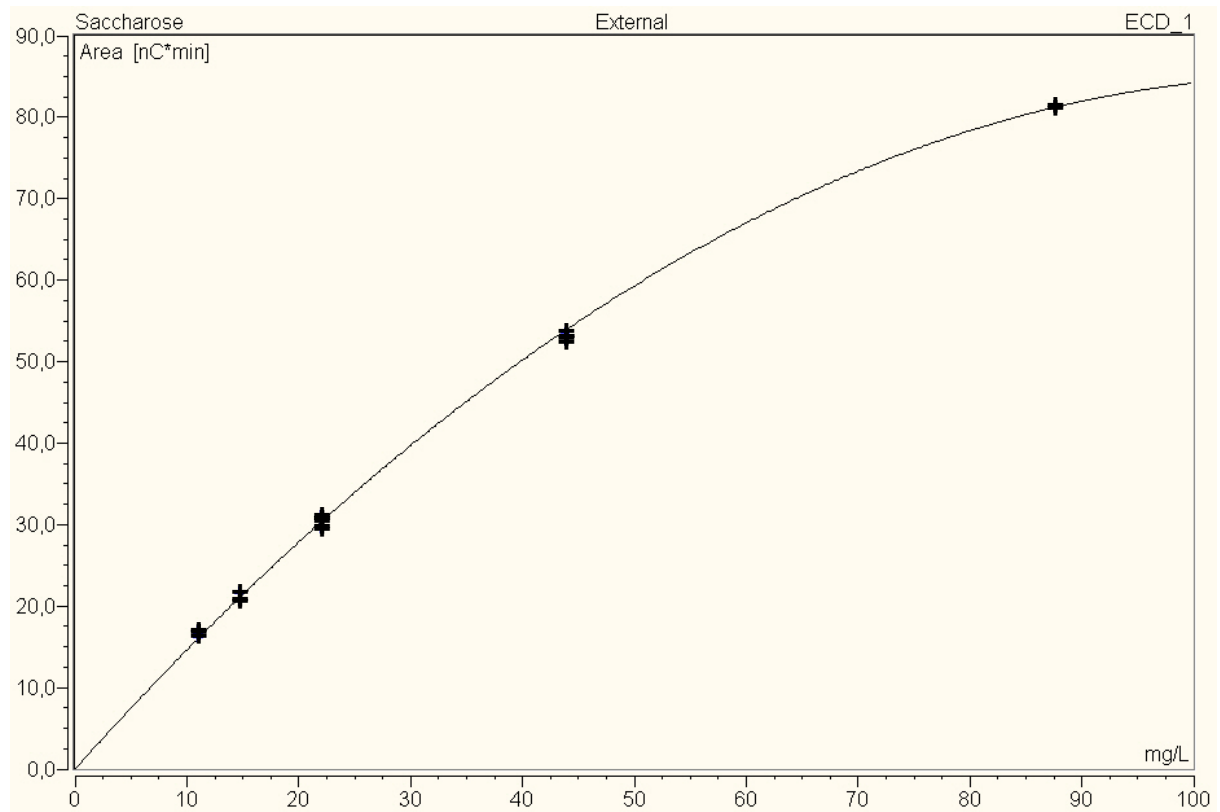


Abb. 76: Kalibrierfunktion von Saccharose

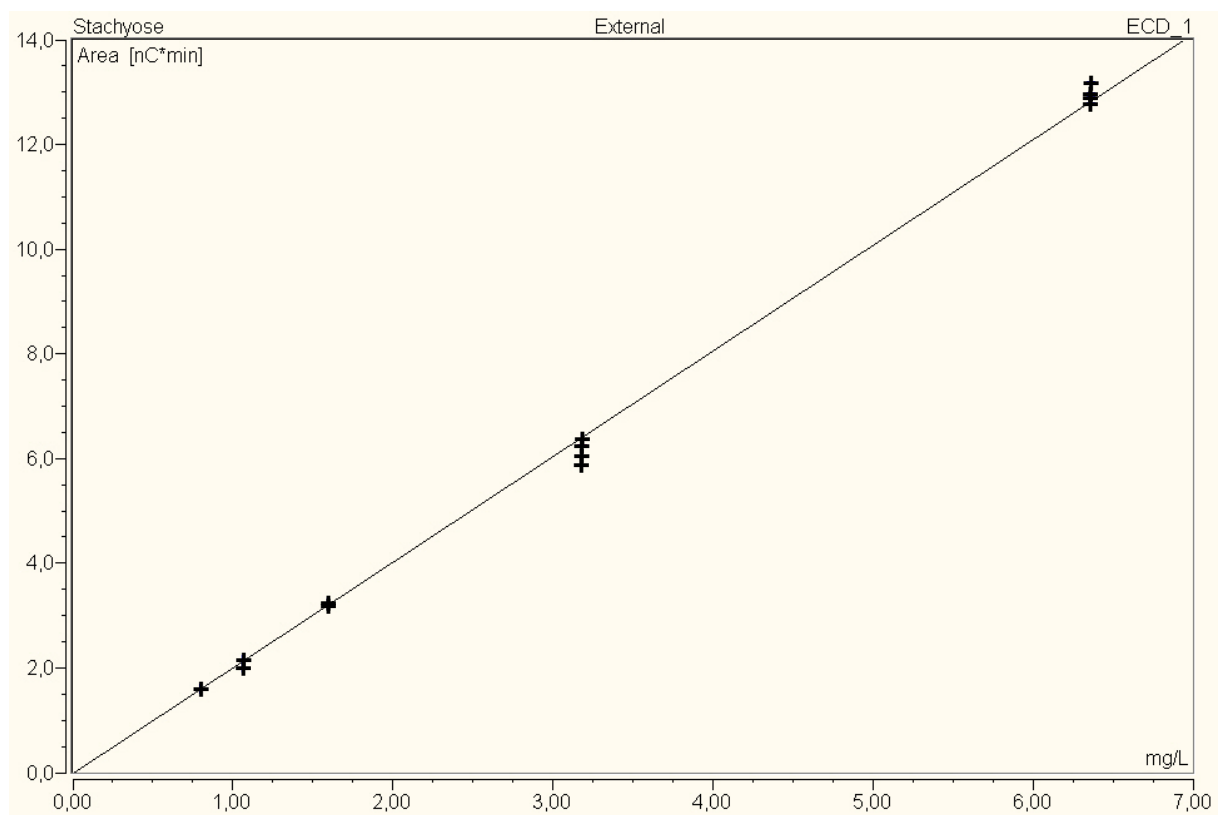


Abb. 77: Kalibrierfunktion von Stachyose

Tabelle 20: Ergebnisse bei Verkostung der Rohkaffeeproben (*Coffea arabica* L. var. Acaiá) der experimentellen Aufbereitungen durch die Verkoster der *Ipanema Agricola LTD* (zusätzlich in portugiesisch).

Kaffeecharge / Aufbereitung			Bewertung	
Portugiesisch (Original)	Englisch	Deutsch	Portugiesisch (Original)	Englisch
Despolpado 01	washed, wet processing	nass I (gewaschen)	apenas mole, limpa, suave, doce, acideis boa, aroma bom, corpo baixo	fine cup, sweet, good acidity, low body, good aroma
Despolpado 02	washed, wet processing	nass II (gewaschen)	apenas mole, mais doce de primeiro, acideis boa, aroma bom	fine cup, more sweetness than Desp. 01, good acidity, good aroma
Cereja 01	pure ripe cherries, unwashed, dry processing	trocken I (ausschließlich reife Kirschen)	bebida dura, adstringente, poco doce, acideis ruin, 1 cup fermentado, corpo forte / bem corpado, aroma bom	good cup, adstringent, hardly sweet, slightly fermented strong body, good aroma
Cereja 02	pure ripe cherries, unwashed, dry processing	trocken II (ausschließlich reife Kirschen)	apenas mole, encorpado, mais suave de la outra (Cereja 01), doce, acideis boa	fine cup, good acidity, good body, more sweetness than Cereja 01, good acidity
Descascada	semi- washed, semi-dry processing	semi-dry I (fermentationslose Nass-Aufbereitung)	apenas mole, doce, acideis boa, corpo equilibrado, aroma bom	fine cup, sweet, good acidity, balanced body, good aroma
Natural	mixed fruits, unwashed, normal dry processing	natural (unsortierte Kirschen, trockene Aufbereitung)	bebida dura corpo medio, acideis media, doce medio, aroma bom	good cup, medium body, medium acidity, med. sweetness, good aroma

Chemikalienliste:

APS	p.a. SERVA
TEMED	reinst 99 %, SERVA
SDS	reinst, Sigma
Diethylpyrocarbonate	app. 97 % NMR, Sigma
Tris	BIOMOL
Bromphenolblau	p.a., Fluka
Natrium Acetat, wasserfrei	p.a., Fluka
Borsäure	p.a., Merck
Polyvinylpyrrolidon	Merck
Phenol-Chloroform	Biomol
Coomassie Brilliantblue G250	Fluka
Guar	Fluka
Sulphosalicylsäure	Riedel-de Haën
NaOH (50 %)	p.a., Fluka
MeOH	Analytical reagent grade, Fisher Scientific
Acetonitril	für HPLC, Acros Organics
Acetonitril	For HPLC gradient grade, VWR
	International, Prolabo
2-Mercaptoethanol	99 %, BIOMOL
OPA	p.a., Fuka
TTC	Sigma
Verwendete Standards:	
D-(-)-Arabinose	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(-)-Fructose	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(+)-Galactose	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(+)-Glucose	HPLC, $\geq 99,5$ %, Fluka
D-(+)-Mannose	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(+)-Raffinose-Pentahydrat	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
L-(+)-Rhamnose (hydrat)	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(-)-Ribose	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(+)-Sucrose	HPLC, $\geq 99,5$ % Fluka
D-(+)-Xylose	HPLC, ≥ 99 %, Fluka
D-(+)-Melezitose (hydrat)	≥ 99 %, Sigma
Stachyose (hydrat, 5% H ₂ O)	p.a., Sigma
Maltose (hydrat)	p.a., Merck
Lactose	p.a., Merck
L-Alanin	p.a., Fluka
L-Arginin-mono-HCl	p.a., Fluka
L-Asparaginsäure	p.a., Fluka
L-Asparagin	p.a., Fluka
L-Glutaminsäure	p.a., Fluka
L-Glutamin	p.a., Fluka
Glycin	p.a., Fluka
L-Histidin-mono-HCl	p.a., Fluka
L-Isoleucin	p.a., Fluka
L-Leucin	p.a., Fluka
L-Lysin-mono-HCl	p.a., Fluka
L-Methionin	p.a., Fluka
L-Phenylalanin	p.a., Fluka

L-Serin	p.a., Fluka
L-Threonin	p.a., Fluka
L-Tryptophan	p.a., Fluka
L-Tyrosin	p.a., Fluka
L-Valin	p.a., Fluka
Norvalin	zur Synthese, Merck-Schuchardt
γ -Aminobuttersäure	$\geq 99\%$, Sigma
Nucleo Spin Extract II – Kit	Macherey & Nagel
DNase I	Sigma
Nde I	MBI Fermentas
Cycle Pure Kit	peqLab
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
Mva 1269 I	MBI Fermentas
CIAP	MBI Fermentas
Biotherm DNA polymerase Buffer	Genecraft
Biotherm DNA Taq Polymerase	Genecraft
Transkriptionspuffer	MBI Fermentas
NTPs	Genecraft
peqGold RNase Inhibitor	peqLab
T7 RNA Polymerase	MBI Fermentas
dNTPs	Genecraft
DMSO	99,5%, Sigma
RevertAid H Minus First Strand	
cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
Puffer R	MBI Fermentas
RNase Inhibitor	RiboLock Ribonuclease Inhibitor